N° D'ORDRE
118

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR DOCTEUR

PAR

Philippe LEBRETON

PREMIÈRE THÈSE

INTRODUCTION A L'ÉTUDE DES FLAVONOÏDES DU HOUBLON

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 8 Octobre 1960 devant la Commission d'Examen

MM. J. COLONGE..... *Président*

R. KUHNER ..... } *Membres*
J. CHOPIN..... } *du Jury*
C. MENTZER..... }

LYON
Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

1960

N° D'ORDRE
118

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR
LE TITRE D'INGÉNIEUR DOCTEUR

PAR

Philippe LEBRETON

PREMIÈRE THÈSE

INTRODUCTION A L'ÉTUDE DES FLAVONOÏDES DU HOUBLON

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 8 Octobre 1960 devant la Commission d'Examen

MM. J. COLONGE..... *Président*

R. KUHNER ..... } *Membres du Jury*
J. CHOPIN..... }
C. MENTZER..... }

LYON
Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42
—
1960

28/62

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

UNIVERSITE DE LYON - FACULTE DES SCIENCES

Doyens Honoraires

MM. LONGCHAMBON
DOUIN
MOUSSA

Professeurs Honoraires

MM. LOCQUIN
de LAREMBERGUE
DOEUVRE
SOLLAUD
MENTZER
MOUSSA

Doyen

M. GAUTHIER H.

Assesseur

M. PRETTRE

Professeurs

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie
DOUIN	Botanique
GAUTHIER H.	Géologie
DEJARDIN	Physique générale
EYRAUD Henri	Calcul différentiel et intégral
PRETTRE	Chimie industrielle
COURTY	Chimie-Physique
KUHNER	Microbiologie et Mycologie
CORDIER	Physiologie
MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée
PARIS	Chimie minérale
AUMERAS	Chimie
COLONGE	Chimie organique
JANIN	Physique générale
FLANDRIN	Géologie appliquée
BERNARD René	Physique industrielle
DUFAY	Astronomie
NIGON	Zoologie expérimentale
VIRET	Géologie
WAUTIER	Zoologie
CHOPIN	Chimie biologique
BRACONNIER	Mathématiques
CUEILLERON	Chimie
EYRAUD Charles	Chimie minérale
BOUTILLIER	Minéralogie
BOIDIN	Botanique
JAFFARD	Mathématiques
MESNARD	Physique
GIGOUT	Géologie
LAFOUCRIERE	Physique nucléaire
DREUX	Chimie organique
GRANDMONTAGNE	Physique

Maîtres de Conférences

MM.	TEICHNER	Chimie industrielle
	DEPRAZ	Physique nucléaire
	FERON	Mathématiques
	PISTOULET	Physique générale
	GAUME	Physique
	PACHECO	Chimie biologique
	PAVANS DE CECCATY	Zoologie
	MERLIN	Chimie M.P.C.
	PHILBERT	Physique nucléaire
	PERES	Physiologie
	LAFORGUE	Physique
	BERSILLON	Physiologie végétale S.P.C.N.
	LEGAY	Zoologie expérimentale S.P.C.N.
	UZAN	Physique S.P.C.N.
	DAVID Louis	Géologie
	GAUTHIER Jean	Chimie
	CHENEVOY	Géologie appliquée
	MAITROT	Physique

Maîtres de Conférences Adjoints

MM.	PIERRON	Chimie
	LEMONDE	Physique

Chargés de Cours Complémentaires

Mme	FIASSON	Zoologie
MM.	PENNANEAC'H	Mathématiques générales
	BERNARD Roger	Physique
	COTILLON	Géologie appliquée
	STRIFFLING	Météorologie et Physique du Globe
	MAZENOT	Géologie - Agrégation
	MURET	Botanique- Agrégation
	FIASSON	Zoologie - Agrégation
	TRANCHAT	Physique-Chimie Agrégation
	SALLES	Mathématiques
	PERNOUX	Physique
	EYRAUD Y.	Physique
	BENE	Physique

Secrétaire

M. BURNET .

TABLE des MATIERES

INTRODUCTION

1. LES LEUCOANTHOCYANNES. Mise au point.
   1.1. Généralités
   1.2. Historique
   1.3. Propriétés des leucoanthocyannes
      1.3.1. Propriétés physiques.
         - organoleptiques;
         - spectrales;
         - chromatographiques.
      1.3.2. Propriétés chimiques.
         - pouvoir réducteur, réactions colorées;
         - action des acides;
         - action des bases;
         - autocondensation, tanins.
   1.4. Analyse des leucoanthocyannes
      1.4.1. Analyse qualitative.
      1.4.2. Analyse quantitative.
   1.5. Structure des leucoanthocyannes
      1.5.1. La fonction diol.
      1.5.2. Stéréochimie.
      1.5.3. Synthèse et dérivés caractéristiques.
      1.5.4. Autres possibilités structurales.
   1.6. Systématique des leucoanthocyannes
      1.6.1. Formes connues; distribution.
      1.6.2. Physiologie et métabolisme; applications industrielles.

ES LEUCOANTHOCYANNES du HOUBLON

   2.1. Le tanin du houblon; étude bibliographique.

2.2. Les leucoanthocyannes du houblon; partie expérimentale. Leucocyanidine et leucodelphinidine.

2.2.1. Analyse qualitative.

2.2.2. Extraction; étude structurale.

2.2.3. Analyse quantitative.

3. LES FLAVONOLS du HOUBLON

3.1. La Quercétine et ses glycosides

3.2. Le Kempférol

3.2.1. Essais préliminaires; papyrographie comparée.

3.2.2. Démonstration de la présence du kempférol.
- Chromatographie préparative;
- cryométrie;
- étude spectrophotométrique U.V.;
- dégradation alcaline.

3.3. Dosage des flavonols

3.4. Autres flavonoïdes

4. METABOLISME des FLAVANOÏDES du HOUBLON

4.1. Statique des flavonoïdes

4.1.1. Selon la localisation dans la plante.

4.1.2. Selon l'individualité du plant.

4.2. Dynamique des flavonoïdes

4.2.1. Evolution saisonnière des leucoanthocyannes.

4.2.2. Evolution saisonnière des flavonols et de l'acide ascorbique .

4.3. Hypothèses biogénétiques

5. ETUDE de quelques METHYL-3-FLAVONOLS

5.1. Synthèse de méthyl-3-flavonols selon ROBINSON
- Méthyl-3 Galangine;
- Diméthyl-3-4'-Kempférol;
- Tétraméthyl-3-3'-4'-5'-Myricétine.

5.2. Propriétés générales des méthyl-3-flavonols
Etude analytique comparée avec les flavones homologues

5.2.1. Etude spectrophotométrique U.V.
- en milieu neutre;
- en milieu alcalin;
- en milieu chélatant (Al^{3+}).

5.2.2. Etude spectrographique I.R.

5.2.3. Propriétés chromatographiques.

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550016_0030

INTRODUCTION

Le Houblon (Humulus lupulus L.) plante herbacée grimpante, répandue en Europe à l'état sauvage et cultivé, est classé dans l'ordre des Urticales, famille (sous-famille) des Cannabinnées.

L'intérêt porté à cette espèce provient de la richesse en résines, tanins, essences, des cônes mûrs des plants femelles; la présence de ces composés est en effet à l'origine de l'utilisation brassicole du houblon, et la seule production annuelle française atteint une quantité moyenne de 2000 tonnes de cônes secs, d'une valeur marchande supérieure au milliard.

Depuis plus d'un siècle, de multiples études chimiques se sont donc attachées à élucider la structure des composés précités, en raison de leur importante influence sur les propriétés organoleptiques de la bière. Les "résines", représentant jusqu'à 20 % du poids des cônes secs, ont été identifiées à l'humulone et à la lupulone (*), tandis que les essences, quelques ‰ , sont de structure terpènique et constituées de myrcène notamment.

Par contre, en ce qui concerne les tanins, force nous est de reconnaître le caractère imprécis, voire contradictoire, des données de la littérature concernant le houblon; les seuls progrès essentiels réalisés en ce domaine sont dûs à des développements très récents de la biochimie des flavonoïdes, et de celle des leucoanthocyannes en particulier.

Ce problème majeur demeurant pratiquement en suspens, l'étude des tanins du houblon constitua, dès la fin de 1955, notre thème essentiel de recherches. Nos premiers travaux sur le sujet furent conduits au Laboratoire de Biochimie de la Faculté libre des Sciences de Lyon, sous la direction de Monsieur le Professeur G. MICHEL, que nous sommes heureux de pouvoir remercier ici de l'initiation à la recherche dont nous lui sommes redevable.

Puis l'orientation donnée à notre étude nous amena à des contacts étroits avec le Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences de Lyon, où il nous fut donné de pouvoir nous initier à la biochimie si intéressante des composés flavoniques. C'est plus particulièrement à Monsieur le Professeur Ch. MENTZER que nous devons cet enrichissement de nos connaissances grâce auquel la chimie du houblon nous apparût dès lors plus accessible; de celà nous tenions à le remercier, comme de l'intérêt avec lequel il a bien voulu considérer nos efforts et nos résultats; puissions-nous en outre avoir appris à son contact à savoir toujours mettre dans nos activités tout l'enthousiasme qui constitue l'une des qualités premières du chercheur.

(*) Formules, vide infra 2.2.2.

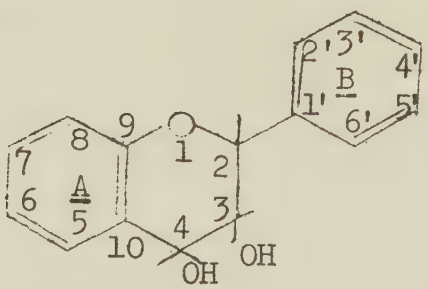
Ce n'est qu'après une interruption de plusieurs mois qu'il nous fût possible de reprendre nos recherches sur les flavonoïdes du houblon; nous tenons à ce sujet à remercier vivemen Monsieur le Professeur J.CHOPIN d'avoir bien voulu nous accueillir dans son laboratoire; nous voulons lui exprimer également toute notre gratitude pour les conseils dont il a fait bénéficier la réalisation de ce travail.

Nous présentons nos respectueux remerciements à Monsieur le Professeur J. COLONGE, qui a bien voulu considérer nos résultat avec bienveillance et nous faire l'honneur de présider ce jury.

Qu'il nous soit permis d'exprimer notre sincère reconnaissance à Monsieur le Professeur R. KÜHNER, qui a bien voulu accepter de juger notre travail, et dont les conseils furent un précieux secours pour nos sommaires connaissances botaniques.

o
o o

La première partie de cette étude est une mise au point de l'état actuel de nos connaissances sur la chimie et la biochimie des leucoanthocyannes (dihydroxy-3-4-flavannes), composés dont



l'intérêt s'est récemment révélé dans de si nombreux domaines, des recherches structurales les plus fondamentales aux applications pratiques les plus diverses.

Le cas particulier des leucodérivés du houblon, à la présence desquels doit être rapportée la plus grande part du comportement de "tanins", constituera le deuxième chapitre de ce travail; nos résultats y seront précédés d'une bibliographie consacrée au problème depuis si longtemps controversé des substances polyphénoliques de cette espèce végétale.

Une troisième partie comportera l'étude des flavonols (hydroxy-3-flavones) du houblon, dont l'étroite parenté structurale avec les leucoanthocyannes suffit à souligner l'importance.

Ces résultats descriptifs seront complétés, dans un quatrième chapitre, d'un essai d'étude biogénétique des flavonoïdes

en leur ensemble; de telles recherches in vivo constituent l'une des tendances les plus actives de la biochimie actuelle. Le métabolisme flavonique du houblon a été suivi chimiquement au cours de l'évolution saisonnière, dans les divers organes de la plante, et en relation avec certains facteurs endogènes ou exogènes.

La dernière partie de ce travail se compose essentiellement d'une étude structurale de quelques méthyl-3-flavonols - composés intermédiaires de la synthèse de flavonols et de leucoanthocyannes de référence -, notamment par comparaison de l'ensemble de leurs propriétés spectrales avec celles des flavones homologues.

Pour la résolution de ces problèmes, il a été surtout fait appel à deux techniques classiques de la chimie biologique :

- formes diverses de la chromatographie de partage ;
- spectrophotomètrie, du domaine de l'U.V. à celui de l'I.R.

1. LES LEUCOANTHOCYANNES. Mise au point

1.1. Généralités.

On peut grouper sous la dénomination de leucoanthocyannes, l'ensemble des composés de type flavanoïde donnant naissance, sous l'action des acides à chaud, à la coloration rouge caractéristique des anthocyannes (cation flavylium).

Bien que l'essentiel de nos connaissances sur les leucodérivés soit dû à de récents apports, ceux de chercheurs anglo-saxons en particulier, il nous a semblé opportun d'ouvrir cette mise au point par un bref aperçu historique.

1.2. Historique.

Dès la fin du siècle dernier, maints chercheurs(1-6), comme STAATS (6) en 1895, n'ont pas manqué d'être frappés par l'intense coloration rouge que prennent certains échantillons végétaux par ébullition en milieu chlorhydrique.

Bien que l'analogie des colorants ainsi obtenus avec les pigments anthocyaniques ait été assez tôt soupçonnée, par TSWETT(5) et WILLSTÄTTER (7) notamment, il fallut attendre les recherches de ROSENHEIM (8) sur les anthocyannes de la vigne, en 1920, pour que fût clairement exprimée la notion de leucoanthocyanne. Puis quelques travaux furent conduits sur "les chromogènes leucoanthocyaniques", notamment en ce qui concerne le problème de l'oxydation, facteur important de cette réaction (9-10), mais c'est à l'ensemble des résultats publiés, peu avant la dernière guerre, par les ROBINSON et coll.(11-16) qu'est due la première contribution fondamentale à l'étude de ce domaine particulier de la chimie flavonique. Quelques travaux ultérieurs (17-22) ne semblent pas marquer de progrès essentiels et conduisent, vers 1953, à l'achèvement de ce que l'on peut considérer comme la période des précurseurs.

A cette date en effet s'ouvre un nouveau chapitre à caractère essentiellement analytique : l'application généralisée de la chromatographie sur papier permet à BATE-SMITH (23-30) et à FORSYTH (31-35) de mener à bien des études plus approfondies sur la nature, la distribution et le rôle des leucodérivés dans de nombreux milieux végétaux.

Mais ces recherches, axées essentiellement sur des objectifs de physiologie végétale, allaient rapidement être complétées par des études structurales où l'aspect organique, synthétique notamment, prit une place importante. Depuis 1956, cette troisième période, initiée surtout par les travaux de F.E.KING (36-40),doit son développement actuel aux contributions majeures de l'Ecole de FREUDENBERG (41-51) et de chercheurs indiens (52-62).

Très tôt cependant, ces recherches fondamentales se doublaient de nombreuses études appliquées, et il serait d'ailleurs bien difficile, comme souvent en pareil cas, de vouloir délimiter les contributions respectives des deux modes de recherche à l'émulation et à l'obtention des résultats.

1.3. Propriétés des leucoanthocyannes

1.3.1. Propriétés physiques.

Les leucoanthocyannes naturels sont incolores à brun-rouge selon leur pureté, souvent amorphes ou parfois cristallisés, mais généralement sans point de fusion bien défini. Ils sont solubles dans les seuls solvants oxygénés, éther éthylique excepté ; leur astringence et leur hygroscopicité ont été soulignées.

Les propriétés spectrales des leucodérivés ont fait l'objet de plusieurs études :

BATE-SMITH et SWAIN (24) ont montré que le maximum d'absorption U.V. de la leucocyanidine (Hexahydroxy-3-4-5-7-3'-4'-flavanne) est situé à 280 mμ. , avec $E^{1\%}_{1cm.}$ = 176. Des positions sensiblement identiques du λ_M ont été données pour la leucodelphinidine (Heptahydroxy-3-4-5-7-3'-4'-5'-flavanne) (59,63).

Ces propriétés sont très proches de celles décrites pour les catéchines (Hydroxy-3-flavannes)(65); ce n'est là d'ailleurs qu'une ressemblance parmi d'autres du comportement de ces deux classes de flavanoïdes, due à leur similitude structurale.

Il semble cependant, comme tendent à le montrer les mesures que nous avons pu effectuer sur des échantillons de leucocyanidine (*), de (+)catéchine (**) et de (-)épiafzéléchine (***), que certaines caractéristiques des spectres obtenus pourraient différencier ces composés :

- l'existence, pour les leucoanthocyannes, d'une valeur relativement faible, inférieure à 3, du rapport E_M/E_m , supérieur par contre à 5 pour les catéchines ;

- l'existence, pour les leucoanthocyannes, d'un éloignement relativement faible, égal à 23 mμ., des λ_M et λ_m, plus élevé chez les catéchines, où il atteint 30 mμ .

Certains auteurs (68-70) ont signalé pour les leucoanthocyannes une seconde bande d'absorption vers 230 mμ. ,longueur d'onde à laquelle nous n'avons observé aucune absorption particulière de notre échantillon de leucocyanidine.

(*) Extraite de Pinus maritima par MASQUELIER (21).
(**) Pentahydroxy-3-5-7-3'-4'-flavanne ($E^{1\%}_{1cm.}$ = 136), extraite de Prunus avium (66).
(***) Tétrahydroxy-3-5-7-4'-flavanne, extraite d'Afzelia sp. par F.E. KING (67).

D'après BATE-SMITH et SWAIN (24), par analyse en milieu sodique-alcoolique, se manifeste, après une évolution de quelques mn., un déplacement bathochrome du maximum d'absorption, à 298 mμ. pour la catéchine et 291 mμ. seulement pour la leucocyanidine.

Par contre, malgré la présence de groupements o-dihydroxylés sur le noyau phényle latéral, nous n'avons observé aucune différence entre les spectres de la leucocyanidine relevés dans l'éthanol pur ou en présence de chlorure d'aluminium; ce fait est probablement dû à l'absence de groupement carbonyle favorisant la chélation, et à la non-conjugaison du noyau B avec l'hétérocycle.

Dès 1956, il nous a été possible de déterminer l'absorption I.R. de la leucocyanidine de Pinus maritima (71) (*) ;l'allure du spectre obtenu a été confirmée en 1958 par FREUDENBERG (46) sur un produit de synthèse, ainsi que tout récemment par MANSON (72) sur de la leucocyanidine extraite de Picea mariana et sur un échantillon synthétique. On remarque dans ces spectres l'absence attendue de la bande d'absorption due à la fréquence carbonyle que présentent par contre les flavon-4-oïdes vers 5,9-6,1 μ. (v.i.5.2.2. en particulier); un certain manque de définition des bandes est à noter, au delà de 8 μ. notamment, attribuable au manque de cristallinité ou à la polymérisation partielle (v.i. 1.3.2.) du leucodérivé.

On doit également à FREUDENBERG (46) le spectre I.R. de la leucofisétinidine, et à CLARK-LEWIS et MITSUNO (73) l'analyse de la mollisacacidine, pentahydroxy-3-4-7-3'-4'-flavannes . Les chercheurs allemands (46) et indiens (63) ont relevé les spectres I.R. de dérivés acétylés, benzylés, et méthylés de leucoanthocyannes naturels.

La chromatographie de partage sur papier a été appliquée avec succès à l'isolement, à la purification et à l'analyse des leucodérivés. Les mélanges naturels sont souvent fort complexes et les meilleurs résultats ont été obtenus par chromatographie bidimensionnelle: le système butanol acétique de Partridge (**) - eau (ou acide acétique 2 %) préconisé par ROBERTS et WOOD (78) pour l'analyse des catéchines, a donné également d'excellents résultats dans le cas des leucoanthocyannes (35,71,79).

Si des taches nettes, traduisant la présence d'entités moléculaires bien définies sont décelables sur de nombreux chromatogrammes (32,35,68,71,73,74,80), des traînées de bas Rf sont également signalées (35,71,75); parfois, ces deux comportements sont présentés successivement par le même mélange, après vieillissement spontané (71), l'évolution correspondante impliquant une étroite relation structurale entre les deux formes responsables (v.i.2.2.2.).

(*) Spectrographe Perkin-Elmer à simple faisceau, modèle 12 C.

(**) Ou butanol secondaire saturé d'eau, selon ROUX (74-77).

Quelques auteurs ont utilisé la chromatographie préparative sur colonne de cellulose (32,68,70) ou de gel de silice (82), tandis que FORSYTH (35) a séparé catéchines et leucoanthocyannes par partage à contre-courant entre l'acétate d'éthyle et l'eau, les leucodérivés, plus hydroxylés, demeurant dans la phase aqueuse.

1.3.2. Propriétés chimiques

La présence dans la molécule des leucoanthocyannes de nombreux groupements hydroxyles, alcooliques et phénoliques, est à l'origine de propriétés réductrices et de réactions colorées, souvent utilisées comme tests d'identification ou pour la révélation des chromatogrammes.

Ainsi PARIS (20) a-t-il noté une coloration verte avec les ions Fe^{3+} et une précipitation par l'acétate neutre de plomb, tandis que FORSYTH (32,35) remarque que les leucodérivés, tout comme les catéchines d'ailleurs, réagissent avec le cyanure de sodium aqueux, la vanilline chlorhydrique, le molybdate de sodium acétique et le nitrate d'argent ammoniacal; le même auteur utilise le réactif Fe^{3+}-ferricyanure comme révélateur chromatographique, et le permanganate N/100 pour la détermination quantitative de chromatogrammes monodimensionnels, après élution de fines bandes de Rf croissants. Aucune fluorescence ne permet de déceler les leucoanthocyannes sur les chromatogrammes examinés en lumière U.V.

Cependant, l'une des réactions les plus intéressantes auxquelles se prêtent les leucodérivés est à coup sûr leur transformation, sous l'action des acides à chaud (HCl 2N au B.M.bouillant par exemple) en anthocyannes correspondants, composés naturels bien connus, intensément colorés en rouge.

La question du mécanisme de cette réaction est des plus importantes et a, dès l'origine, retenu l'attention des chercheurs: une oxydation concomitante est-elle nécessaire ou la réaction s'effectue-t-elle sans "dénivellation rédox" ? Bien que la transformation ait pu être réalisée - et avec d'excellents rendements - dans l'isopropanol chlorhydrique en tube scellé (*) (83-87) , de nombreux auteurs ont souligné la nécessité d'une oxydation :SWAIN (88) a même noté que la réaction est en grande partie inhibée sous atmosphère d'azote. Les ROBINSON (11) notèrent tout d'abord que leucoanthocyannes et anthocyannes sont au même état d'oxydation, mais revinrent par la suite (13,14) sur cette conception. On touche là en fait à un problème auquel réponse ne peut être apportée sans l'appui de données structurales (v.i. 1.5.1. et 1.5.4. in fine).

(*) Mais un tel milieu est-il bien exempt d'oxygène ?

Notons cependant qu'une phase de déshydratation semble se dérouler en premier lieu : ROUX et BILL (89), opérant dans l'isopropanol chlorhydrique anhydre, observent deux taches chromatographiques à partir d'un seul leucodérivé; dans ces conditions, à côté de l'anthocyanne, se formerait l'éther isopropylique en 3 de ce dernier.

D'autre part, de petites quantités du flavonol correspondant pourraient apparaître dans certaines conditions opératoires (86,88).

Il n'en demeure pas moins que cette réaction est totalement spécifique, et qu'elle respecte les groupements hydroxyles phénoliques du squelette hydrocarboné, ce qui justifie pleinement ses emplois analytiques. ROUX (74) utilise la vaporisation d'une solution éthanolique d'acide p-toluène-sulfonique, suivie d'un chauffage du chromatogramme, pour la révélation des leucodérivés; cette technique se montre préférable à son équivalent chlorhydrique.

Le rendement de la réaction de transformation en milieu HCl aqueux est très variable, de 5 à 25 % selon le mode opératoire; il peut atteindre des chiffres plus élevés, voisins de 40 %, en milieu alcoolique. A côté des anthocyannes se forment des "phlobaphènes", produits bruns, amorphes, également observés dans le cas des catéchines; des composés identiques précipitent lentement par action d'acides dilués et froids sur les leucoanthocyannes et catéchines.

L'action des bases a fait l'objet de très peu d'études à l'heure actuelle: comme la plupart des flavonoïdes, les leucoanthocyannes se scindent, avec un bon rendement, en produits phénoliques simples par fusion alcaline. Cette réaction, effectuée à l'échelle microanalytique selon MAURICE et MENTZER (90) nous a permis l'identification de la leucocyanidine et de la leucodelphinidine (71).

Une autre propriété chimique des leucoanthocyannes doit être mentionnée, ne serait-ce qu'en raison de l'intérêt et des controverses qu'elle suscita :

Dès 1953, BATE-SMITH (24,27), frappé par la large distribution des leucodérivés et le peu de sélectivité des tests, notamment histochimiques, de détection des tanins, avança l'hypothèse que les leucoanthocyannes puissent en être, en certains cas, des constituants essentiels. A l'appui de cette opinion, de nombreuses propriétés peuvent être mentionnées: astringence, adsorption avec la poudre de peau et la cellulose, précipitation avec la gélatine, les alcaloïdes et le formol chlorhydrique, et les nombreuses réactions colorées précitées.

Toutefois ces propriétés ne s'attachent pas toutes à la molécule des leucoanthocyannes en elle-même, mais ne se manifestent qu'après une modification structurale, généralement aisée, due à des phénomènes d'autocondensation, déjà étudiés pour les catéchines.

A côté d'indices chromatographiques (rétention à l'origine des chromatogrammes), l'existence de polymères a pu être prouvée par mesures ébulliométriques: ROUX, dont les travaux sont nombreux sur cet aspect du problème (75,76,91,92), a déterminé ainsi des masses moléculaires échelonnées de 600 à 2500 pour diverses fractions leucoanthocyaniques du tanin de québracho, soit un degré de polymérisation de 2 à 8 environ. HILLIS (87, 93, 94) a apporté également des arguments en faveur de cette thèse; celle-ci semble actuellement communément admise, et les réserves formulées par WHITE (95) notamment ne semblent pas avoir été finalement retenues, même par leur auteur (96-98).

Cependant nos connaissances, bien que guidées par des analogies structurales avec les catéchines, sont relativement réduites en ce qui concerne le mécanisme chimique de cette condensation. TAYEAU et MASQUELIER (21) proposent un doublement moléculaire en C_4, tandis que FREUDENBERG (44,51) note que la polymérisation des leucodérivés est plus rapide que celle des catéchines; un mode de liaison très probable est constitué par un pont C_4-C_8 (ou C_4-C_6) entre deux molécules, différent par conséquent de celui des catéchines où un dimère se forme par ouverture de cycle dans une première molécule et pontage C_2-C_6 avec une seconde non modifiée. Comme dans le cas des catéchines, il semble que le processus de condensation est favorisé par la présence d'hydroxyles phénoliques libres en 7 et 4'.

Notons enfin que l'oxydation semble également jouer un rôle important dans ces phénomènes, mais des systèmes enzymatiques particuliers peuvent orienter les réactions dans des sens très différents: pour HILLIS et CARLE (94), la leucodelphinidine d'Eucalyptus sp. peut être oxydée, en présence d'acide gallique, pour former des tropolones; HATHWAY (82), étudiant la formation de phlobatanins par oxydation aérobie de la leucodelphinidine en présence de polyphénolase de Quercus sp., propose un mode de liaison $C_{2'}$-$C_{6'}$, comme pour la gallocatéchine (Hexahydroxy-3-5-7-3'-4'-5'-flavanne).

1.4. Analyse des leucoanthocyannes.

De l'ensemble des propriétés précédemment décrites peuvent se dégager les techniques d'identification et de dosage des leucodérivés dans les milieux végétaux.

1.4.1. Analyse qualitative.

Dès les travaux des ROBINSON, les leucodérivés furent analysés par l'intermédiaire des anthocyannes résultant du traitement chlorhydrique; ces derniers, tout d'abord identifiés par réactions colorées et coefficients de partage entre solvants, se virent appliquer en 1954 par BATE-SMITH (25) les méthodes élégantes

et sensibles de la chromatographie sur papier et de la spectrophotométrie dans le visible.

Combinées avec ces techniques, les propriétés de solubilité des anthocyannes dans le n-butanol ou l'alcool isoamylique permettent d'obtenir, à partir de milieux naturels complexes, une spécificité, une sensibilité et une simplification fort appréciables de l'analyse et de ses résultats.

L'emploi de solvants chromatographiques fortement acides est indispensable pour une bonne résolution analytique, en raison de l'influence du pH sur la stabilité du cation flavylium. Depuis l'apport fondamental de BATE-SMITH, divers auteurs, notamment HILLIS (84-87) et ROUX (74-99) ont proposé quelques variantes dans le choix des solvants; on trouvera dans les mises au point de HARBORNE(100) l'ensemble des techniques chromatographiques actuellement disponibles pour l'analyse des aglycones anthocyaniques.

La spectrophotométrie en milieu alcoolique acide peut être complétée, pour la détection des groupements o-dihydroxylés sur le noyau B, par l'emploi de réactifs chélatants comme les ions Al^{3+} ; leur effet bathochrome, étudié par GEISSMANN (101), a été utilisé par KEPPLER (70) et ROUX (74) en particulier. HARBORNE(102) et P. RIBEREAU-GAYON (103) ont résumé récemment les données spectrophotométriques concernant la caractérisation des anthocyannes.

Si l'on ajoute à ces techniques l'emploi de la fusion alcaline, on constatera que les méthodes "indirectes" sont en définitive les plus utiles pour l'analyse des leucodérivés dans les milieux naturels; cette remarque ne fait que souligner le manque de sélectivité des propriétés de la structure leucoanthocyanique, à l'égard des catéchines notamment, et la faillite fréquente de l'analyse organique classique (P.F., analyse élémentaire) due à l'instabilité "décourageante" de tels composés. Cependant certains dérivés méthylés et acétylés, dans lesquels les groupements hydroxyles se trouvent en tout ou partie protégés, se prêtent assez bien à ces dernières méthodes (36,59,63,68,70,73,82), dans la mesure toutefois où le leucodérivé est accessible en quantité et pureté suffisantes.

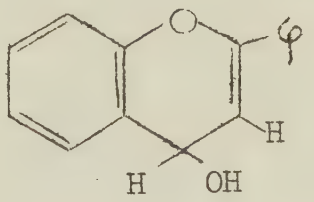
1.4.2. Analyse quantitative.

Là également, la transformation en anthocyannes a été mise à contribution, surtout en raison de sa spécificité, de sa commodité et de sa sensibilité. La reproductibilité des résultats ne peut être assurée que par l'emploi d'un mode opératoire rigoureusement standardisé, encore celà ne garantit-il pas leur validité absolue; il se pose en effet le problème important et délicat de l'étalonnage des mesures (v.i. 2.2.3.). HILLIS (84-87,104) utilise un traitement en milieu alcoolique, tandis que d'autres auteurs (21,71,105) opèrent en milieu aqueux, avec ou sans extraction ultérieure.

1.5. Structure des leucoanthocyannes

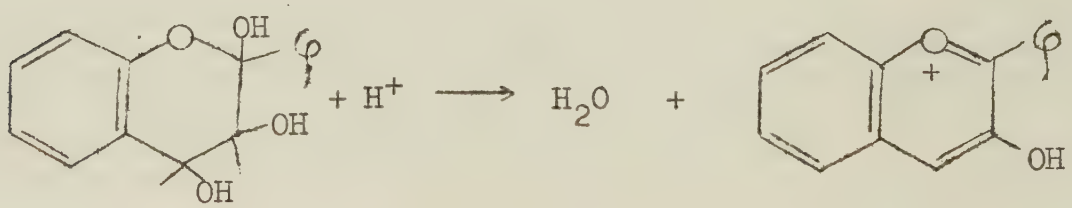
1.5.1. La fonction diol.

Une première structure fut proposée en 1920 par ROSENHEIM (8), qui voyait dans les leucodérivés la pseudobase des anthocyannes correspondants, sous la forme :



Mais cette conception implique deux propriétés non vérifiées par l'expérience: anthocyannes et leucoanthocyannes seraient ainsi au même degré d'oxydation; le passage de la seconde à la première des deux formes devrait s'effectuer par simple acidification sans chauffage. FORSYTH (33) a toutefois retenu momentanément cette hypothèse, dans un cas très particulier cependant.

Les ROBINSON (11) notèrent le peu de vraisemblance de cette première formule, et proposèrent une deuxième représentation où le degré d'oxydation ne se trouve cependant pas modifié dans la réaction de transformation :



R. ROBINSON (13) et G.M. ROBINSON (14) ont d'ailleurs implicitement reconnu par la suite les faiblesses d'une telle formulation, reprise notamment par TAYEAU (21), mais il fallut attendre près de 20 ans pour que fût avancée par BATE-SMITH(23,24), puis démontrée la structure diol (Dihydroxy-3-4-) des leucoanthocyannes.

Depuis 1954 en effet, des preuves multiples ont été obtenues de la réalité de ce fait, aussi bien par des techniques analytiques que par des démonstrations synthétiques.

La réduction de flavonols et de flavanonols (Hydroxy-3-flavanones) en composés possédant toutes les propriétés générales des leucoanthocyannes (*) prouve en effet l'absence d'un groupement alcool tertiaire en C_2 .

BAUER, BIRCH et HILLIS (106), par réduction de la quercétine (Tétrahydroxy-5-7-3'-4'-flavonol) acétylée obtiennent une gomme donnant naissance à de la cyanidine par traitement chlorhydrique à chaud, tandis que F.E. KING (38-40) parvient à de la tétraméthyl-mélacacidine (Hexahydroxy-3-4-7-8-3'-4'-flavanne) cristallisée à partir du flavonol correspondant.

Les flavanonols sont un produit de départ plus utilisé: SWAIN (88) obtient de la leucocyanidine amorphe par réduction de la taxifoline (Tétrahydroxy-5-7-3'-4'-flavanonol), et FREUDENBERG et ROUX (41) passent ainsi de la dihydrorobinétine (Tétrahydroxy-7-3'-4'-5'-flavanonol) au leucodérivé puis à l'anthocyanne correspondants. Il en est de même de KEPPLER(70) parvenant à la mollisacacidine à partir de la fustine (Trihydroxy-7-3'-4'-flavanonol), de FREUDENBERG et coll.(41,43,45,46) et d'auteurs indiens(53,57,63) dans plusieurs séries naturelles.

Toujours à partir du flavanonol correspondant, mais dans des séries inconnues in natura, on doit à BOGNAR et RAKOSI (107) la synthèse du leucoanthocyanne type (c.à.d. non substitué sur les noyaux phényles) et à KULKARNI et JOSHI (52,54,58) l'obtention des méthyl-6-méthoxy-4'-leucodérivés.

Bien que les preuves analytiques, c'est-à-dire celles prenant les leucoanthocyannes comme point de départ, soient souvent moins probantes, tout au moins en ce qui concerne la fonction diol notamment l'analyse élémentaire, en raison des isoméries possibles, ou le passage au flavanol correspondant par oxydation selon Oppenauer (F.E. KING (36,37,40)), un éventuel hydroxyle en 2 pouvant s'éliminer en cours d'opération - l'oxydation périodique de leucodérivés a permis à KEPPLER (68,70) et à SESHADRI (63) de prouver également l'exactitude de la structure α-glycol,1,8 à 2 équivalents oxygène étant consommés dans cette réaction. On peut citer enfin le fait assez général de l'obtention de diacétates, après méthylation des hydroxyles phénoliques.

Quant à l'emplacement des groupements phénoliques, problème déjà traité en fait sous l'aspect analytique (v.s. 1.4.1.), on peut ajouter que la dégradation oxydante après méthylation permet d'en confirmer la position par examen des produits réactionnels (37,40,59,63,70); tout inhabituel qu'il soit, le passage aux catéchines correspondantes, par réduction, est également à signaler (47,49).

(*) A l'exception naturellement de l'activité optique (v.i. 1.5.2.)

1.5.2. Stéréochimie des leucoanthocyannes.

La plupart des leucodérivés naturels sont optiquement actifs; la formule plane précédemment adoptée laisse bien apparaître en effet des centres d'asymétrie en C_2, C_3 et C_4 . Ces trois atomes de carbone asymétriques conduisent théoriquement à l'existence de quatre racémiques distincts, soit huit stéréoisomères actifs éventuels in natura.

La stéréochimie des leucoanthocyannes a été plus particulièrement étudiée par des auteurs britanniques et indiens; on doit cependant à l'Ecole de FREUDENBERG une récente et importante contribution dans ce domaine.

Du point de vue de l'isomérie bayerienne, la position relative des substituants en 2, 3 et 4 peut être atteinte par des preuves chimiques directes et doit s'envisager en deux temps :

- position en 3-4 ;
- position en 2-3 (et -4 par voie de conséquence).

Le premier problème est donc en fait la stéréochimie de la fonction diol; sur les produits naturels, toutes les données concordent sur sa nature cis : les leucodérivés se prêtent à la formation de carbonates cycliques (37,39,40), de dérivés isopropylidèniques (39,45,48,108), de complexes boriques (70).

D'autre part, KING (39,40) a obtenu, par réduction catalytique du flavonol correspondant, un racémique possèdant les propriétés (spectre I.R. notamment) de l'éther tétraméthylique (des hydroxyles phénoliques) de la mélacacidine naturelle.. Comme il est admis que dans ces conditions les atomes d'hydrogène se fixent généralement en cis sur une double liaison, ce leucoanthocyanne doit donc avoir la structure phényl(2)-hydroxy(3) : cis ; hydroxy(3)-hydroxy(4) : cis également.

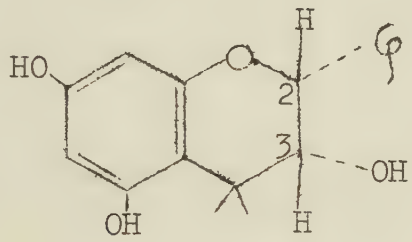
Par contre, faute de preuves analytiques directes, une représentation plus complète ne peut s'envisager sans référence aux données récemment acquises sur la configuration absolue des catéchines (*). On a pu en effet rattacher la stéréochimie des leucodérivés à celle des catéchines, par passage des premiers aux secondes par réduction catalytique (46-49), et par comparaison des pouvoirs rotatoires (50).

Or la configuration absolue de la série des catéchines est connue : BIRCH, CLARK-LEWIS et ROBERTSON (109), en particulier, appliquant successivement la méthode d'ouverture de cycle par réduction avec obtention de propanols substitués actifs, et la méthode de réaction d'organo-magnésiens sur les esters phénylglyoxyliques des carbinols actifs selon PRELOG (110), avec formation

---

(*) Ou, moins commodément, des flavanonols (Voir (45-50) et ci-dessous 1.5.3. in fine).

d'acides atrolactiques substitués actifs, ont montré, par exemple, que dans la (-)épi-catéchine, le phényle en 2 est en cis par rapport à l'hydroxyle en 3, et situé de plus en dessous du plan moyen de la molécule dans la représentation ci-dessous :



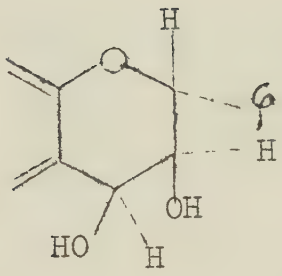
(-)épi-catéchine

(-)épi-catéchine et (+) catéchine sont des épimères au niveau de l'hydroxyle en 3, tandis que (-)épi-catéchine et (-) catéchine sont des épimères au niveau du phényle en 2. Les résultats de FREUDENBERG (111) et de HARDEGGER et coll. (112) aboutissent aux mêmes conclusions.

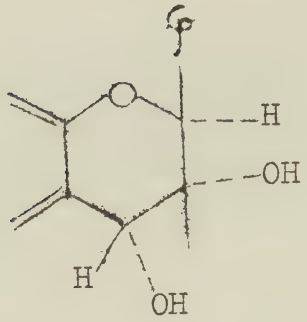
Selon WEINGES (49,50), la (+) leucocyanidine (46,63) et la (+) leucorobinétinidine (Hexahydroxy-3-4-7-3'-4'-5'-flavanne) (41,45,47) sont comparables à la (+) catéchine; par contre, la (-) leucofisétinidine (49,76,92) a la configuration de la (-)catéchine. C'est là une différence avec la série des catéchines, où seule la (+) catéchine - et la (-)épi-catéchine - semblent être des composés réellement naturels; on connait d'ailleurs la(+)leucofisétinidine, ou mollisacacidine ou gléditsine (68,70,73), qui appartient donc elle aussi à la série (+)catéchine, ce qui constitue le seul exemple actuellement connu d'un couple d'énantiomorphes naturels (Propriétés comparables; donnant par mélange un racémique identique à un produit de synthèse (108)). On a également mentionné (59,60) l'existence d'une (-) et d'une (+)leucodelphinidine, mais la stéréochimie de ces composés ne semble pas pouvoir être dès maintenant définie.

D'autre part, les résultats cités de KING (36,37,39,40) montrent que la mélacacidine (Phényl(2)-hydroxy(3) : cis) possède la configuration relative des épi-catéchines; son pouvoir rotatoire indique de plus qu'il s'agit vraisemblablement d'un "(-)épi-leucodérivé".

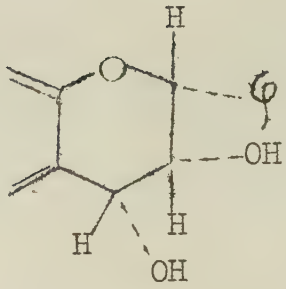
En conclusion, sur les huit structures stéréoisomères possibles, seules trois, correspondant à deux racémiques distincts (sur quatre) sont actuellement reconnues in natura :



Leucodérivés du type (+)catéchine



Leucodérivé du type (-)catéchine



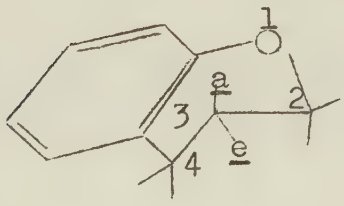
Leucodérivé du type (-)épi-catéchine

Il convient de souligner que le groupement hydroxyle en 4 ne semble pas jouer pour créer d'isomérie, puisque sa position est toujours cis par rapport à l'hydroxyle en 3, quelle que soit la position de ce dernier. Mais cela est-il suffisant pour déclarer dès maintenant que "vraisemblablement les huit formes possibles n'existent pas dans la nature" (50) ?

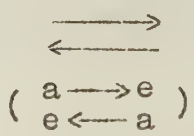
Par synthèse par contre, JOSHI et KULKARNI (52,54-56,58) ont obtenu les quatre racémiques du dihydroxy-3-4-méthyl-6-méthoxy-4'-flavanne, suivant les produits de départ et les conditions opératoires. Ces auteurs ont également synthétisé plusieurs racémiques dans la série de la mélacacidine et dans celle de la mollisacacidine (53,56,57).

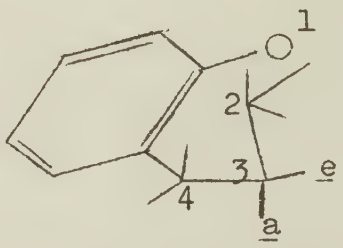
Il ne conviendrait pas cependant de passer sous silence les conceptions modernes de la conformation stéréochimique, et notamment les applications à la série flavanique qu'en ont fait les auteurs anglais (39,40,108,113-115).

Selon ces données, la structure chromanne présente une conformation en demi-chaise due à la saturation partielle de l'hétérocycle oxygéné (Cf.structure des cyclohexènes), dans laquelle les divers substituants en 2, 3 et 4 se présentent suivant des directions de valence sensiblement axiales et équatoriales :



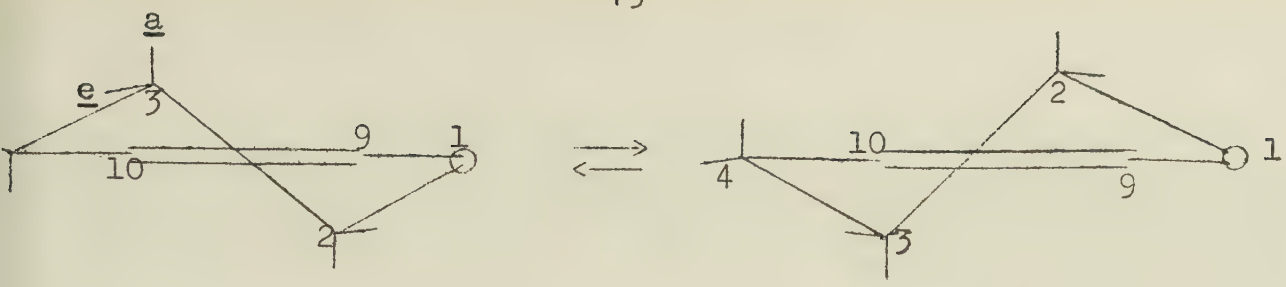
(I)





(I bis)

Vue perspective



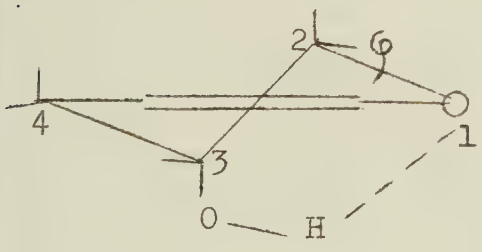
(II) (II bis)

Vue frontale au plan du noyau benzénique accolé à l'hétérocycle.

Représentations stériques des conformations en demi-chaise du chromanne.

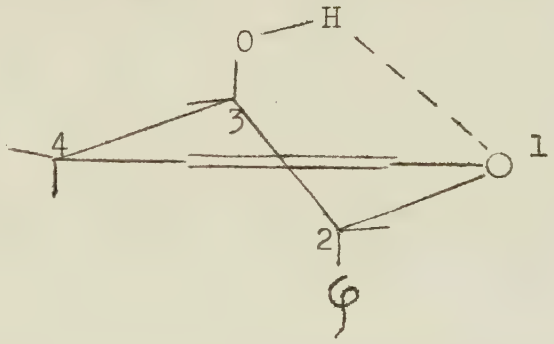
Dans ce mode de représentation, la (-)épi-catéchine peut se décrire comme : phényl(2):e, hydroxy(3):a, l'allure générale du cycle étant la forme figurée en (I bis) et (II bis).

WHALLEY (114) a noté en effet que les éthers tétraméthyliques de la (-)épi-catéchine et de la (+)catéchine présentent un spectre I.R. où la fréquence de la bande d'absorption caractéristique du groupement -OH se trouve déplacée de 3630 à 3590 cm^{-1}, ce qui indique l'existence d'une liaison hydrogène entre l'hydroxyle en 3 et l'oxygène en 1. La (-)épi-catéchine doit donc exister préférentiellement sous la forme (I bis, II bis); c'est l'inverse, forme (I, II) pour la (+)catéchine. Seules ces conformations, étant donné l'orientation des divers substituants, s'accordent avec l'ensemble des données expérimentales:



(-)épi-catéchine

Phényl-2(e)-hydroxy-3(a), ou cis; phényle en dessous du plan moyen



(+)catéchine

Phényl-2(a)-hydroxy-3(a), ou trans; phényle en dessous du plan moyen.

Si l'on manque de données aussi directes en ce qui concerne les leucoanthocyannes, les raisonnements par analogie et l'application de règles plus générales (acquises surtout dans la stéréochimie des stérols) permettent souvent de recouper ou de préciser des données plus classiques.

Ainsi, les résultats obtenus par KING sur la mélacacidine (2-3 cis; 3-4 cis, en ce qui concerne les substituants "lourds") peuvent se traduire par deux possibilités conformationnelles (forme I, II) : phényl-2(a)-hydroxy-3(e)-hydroxy-4(a), ou bien, inversement, 2(e)-3(a)-4(e). C'est en faveur de la seconde de ces deux formes que se prononce KING, car elle conduit au maximum de substituants lourds en position équatoriale (*) ; notons qu'une liaison hydrogène du type précédemment décrit est alors possible.

D'autre part, si l'on admet avec MAHESH et SESHADRI (116) que les flavanonols naturels se présentent sous la conformation 2(e)-3(e) (ou trans), il devient plus facile d'interpréter la stéréochimie des leucodérivés de synthèse, comme l'on fait notamment JOSHI et KULKARNI (loc. cit.): à partir des flavanonols naturels, on n'obtient que des leucoanthocyannes de la série "catéchine"(49), et l'on admet que la réduction par l'hydrure de Li-Al d'un carbonyle(en 4) sans empêchement stérique conduit à un hydroxyle équatorial, axial par contre par réduction catalytique en milieu acide.

Notons cependant pour conclure, l'objection, déjà relevée par SWAIN et BATE-SMITH (29) que constituent les résultats de BOGNAR et RAKOSI (107): quelles que soient les conditions opératoires, ces auteurs ont toujours obtenu le même leucodérivé racémique par réduction du flavanonol correspondant.

1.5.3. Synthèse et dérivés caractéristiques.

A ces deux rubriques, il a déjà été fait implicitement de fréquents appels, lors de l'étude structurale des leucodérivés. Nous avons vu que les flavanonols sont le point de départ le plus courant des procédés de synthèse, comme, dans une moindre mesure, les flavonols, avec une orientation stérique d'ailleurs différente.

Il convient de citer un travail isolé bien antérieur de MOZINGO et ADKINS (117) : par hydrogénation catalytique sur CuO(Cr), à 145°C, dans l'éthanol anhydre et sous 150 atm., ces auteurs, en 1938, ont obtenu un diol à partir du flavonol, avec un rendement de 17 %; à partir de la quercétine par contre, la réaction n'a pas lieu.

(*) Remarquons que cette règle n'a rien d'absolu: la (+)catéchine, stabilisée par la liaison hydrogène, se présente (forme I, II) préférentiellement avec la conformation 2(a)-3(a).

La quercétine, même tétraacétylée, semble un point de départ à peine plus satisfaisant à BAUER et coll. (106) : par réduction par $LiAlH_4$, il se forme en effet un produit amorphe dont une partie donne à froid en milieu acide la coloration rouge de la cyanidine, tandis que l'autre fraction répond bien par contre à la définition d'un leucodérivé (à côté du diol se formerait un dihydroxy-3-4-flav-ène-2).

Par contre KING (38-40) a réussi le passage au racémique de l'éther tétraméthylique de la mélacacidine à partir du flavonol correspondant, comme déjà noté. L'hydrogénation catalytique sur Ni Raney, à 105°C, sous 100 atm., est préférable à la réduction par Li Al H_4 : elle seule donne le leucodérivé cristallisé; rendement : 40 %. Enfin c'est par le même procédé que KASHIKAR et KULKARNI (58) ont obtenu le quatrième racémique du méthyl-6 méthoxy-4'-leucoanthocyanne.

L'aromadendrine (Trihydroxy-5-7-4'-flavanonol) acétylée a servi de matière première à BAUER et coll.(106) qui obtiennent,par Li Al H_4, une gomme d'où l'anthocyanne correspondant (pélargonidine) peut être produit par traitement chlorhydrique à chaud. SWAIN (88) a également tenté le passage des flavanonols aux leucodérivés , en l'occurence de la taxifoline (ou mieux de son éther tétraméthylique) à la leucocyanidine, amorphe, par l'hydroborure de sodium; à ce sujet, FREUDENBERG (43) a noté que le produit est obtenu sous forme d'un mélange d'isomères engagés dans des complexes boriques et polymérisés en grande part. Les mêmes réactions ont été réalisées depuis par GANGULY et SESHADRI (63) et par MANSON (72).

Dans la série déjà citée des méthyl-6-méthoxy-4'-leucodérivés, JOSHI et KULKARNI (52) ont obtenu les deux premiers racémiques, épimères en 4, à partir du flavanonol correspondant, à l'aide de $LiAlH_4$; le troisième terme de la série a été atteint sous forme de son diacétate (54-56) par la voie détournée de la bromo-3-flavanone , avec réduction par $LiAlH_4$ également.

A partir du flavanonol type, BOGNAR et RAKOSI (107) ont obtenu un seul racémique par hydrogénation catalytique sur charbon palladeux en milieu éthanolique ou acétique, ou par réduction chimique par l'hydroborure de sodium dans le méthanol ou l'hydrure de lithium-aluminium dans l'éther; les rendements sont voisins de 75 %.

Deux voies différentes ont permis à KEPPLER (70) et à CHANDORKAR et KULKARNI (57) la synthèse de leucoanthocyannes du groupe de la mollisacacidine : l'hydrogénation catalytique sur oxyde de platine dans le méthanol anhydre conduit à un leucodérivé identique au produit naturel (70), tandis que le mélange obtenu par réduction par $LiAlH_4$ du triméthoxy-7-3'-4'-flavanonol peut être séparé en deux isomères dont l'un est comparable à l'éther triméthylique du produit naturel (57); ces essais confirment la configuration trans en 2-3 (ou "catéchine") de ce leucoanthocyanne. Il en est autrement, nous l'avons vu, de la mélacacidine de KING ; aussi ne convient-il pas de s'étonner de ce que les deux racémiques

auxquels parviennent JOSHI et KULKARNI (53,56) par réduction chimique ou catalytique du flavanonol correspondant (2(e)-3(e)-4(e) et 2(e)-3(e)-4(a) respectivement), soient différents de l'éther tétraméthylique du composé naturel comme du produit de réduction du flavonol correspondant (2(e)-3(a)-4(e)) (38-40).

Les travaux de FREUDENBERG et coll. ont mis en évidence et justifié les difficultés rencontrées dans la réduction de certains flavanonols, dues aux comportements parfois différents que peuvent manifester les termes de cette série chimique : en effet, si la dihydrorobinétine (41,45) et la dihydrofisétine ((-)fustine (45,49)) fournissent aisément, par réduction catalytique sur oxyde de platine, les leucodérivés correspondants avec des rendements sensiblement quantitatifs, la taxifoline par contre (43,46) et l'aromadendrine (118) nécessitent une benzylation préalable des hydroxyles phénoliques; ceci est dû à l'existence d'une liaison hydrogène entre l'hydroxyle en 5 et le carbonyle en 4, mise en évidence par le déplacement de la bande = CO dans le spectre I.R. (46). Le carbonyle ainsi libéré du dérivé tétrabenzylé de la taxifoline (ou de son acétate en 3) peut être alors réduit par $LiAlH_4$ dans le tétrahydrofuranne, puis on élimine les groupements benzyles protecteurs par hydrogénation catalytique, à l'aide de palladium sur $BaSO_4$, dans le diméthylformamide. Tout ceci explique mieux les échecs partiels précédemment rencontrés (88,106) dans la réduction (chimique) de ces deux flavanonols.

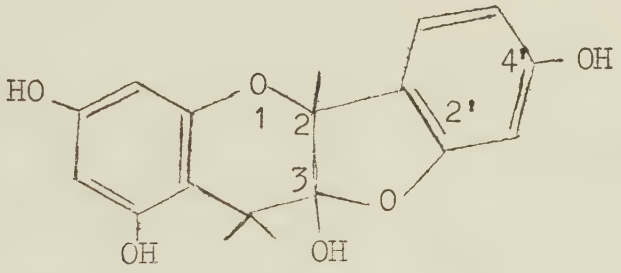
Mais dans des conditions opératoires quelque peu différentes, la réduction des flavanonols peut franchir le stade des leucoanthocyannes et aboutir aux catéchines (58), ce qui peut s'obtenir par exemple par réduction catalytique sur palladium, en solution dans le dioxanne (46,47,49,50); ceci constitue un mode précieux d'analyse stérique (on passe ainsi de la (+)taxifoline à la (+)catéchine, ce qui confirme la structure trans en 2-3 des flavanonols naturels et des leucodérivés intermédiaires (49)) , comme une préparation inédite des catéchines, avec l'avantage d'obtenir des composés optiquement actifs si l'on part de flavanonols naturels; des leucodérivés on passe aux catéchines avec un rendement de 50 à 70 %.

Bénéficiant d'une stabilité et d'une aptitude à la cristallisation supérieures à celles des leucoanthocyannes polyhydroxylés, les dérivés méthylés et acétylés ont fait l'objet de synthèses nombreuses; les plus fréquents sont les dérivés partiellement méthylés (méthylation des hydroxyles phénoliques par le diazométhane) et les acétates de la fonction diol ainsi demeurée libre, ainsi que les dérivés totalement méthylés (par le sulfate de méthyle) ou totalement acétylés (par l'anhydride acétique en milieu pyridinique à froid). Moins fréquents par contre sont les dibenzoates (57) et di-p-nitrobenzoates (107), ainsi que les dérivés benzylés des fonctions phénols (43,46).

1.5.4. Autres possibilités structurales.

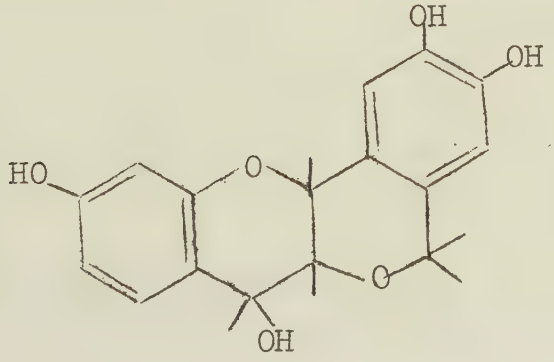
Aussi séduisante que puisse apparaître, d'un point de vue purement taxonomique, l'assimilation des leucoanthocyannes à la seule structure dihydroxy-3-4-flavanne, il convient pourtant de mentionner quelques cas particuliers où cette conception, peut-être un peu trop simpliste, semble avoir été prise en défaut. En effet, non seulement par synthèse, mais également à partir de sources naturelles, certains auteurs ont obtenu ou isolé des composés présentant tout ou majeure partie des propriétés générales des leucodérivés, à l'exception de la fonction diol précitée.

La cyanomaclurine, découverte par PERKIN (119) dès 1895 dans Artocarpus integrifolia, semble se tenir à mi-chemin des leucoanthocyannes et des catéchines : donnant, comme ces dernières, un précipité brun en milieu acide, elle conduit toutefois, d'après les observations de ROBINSON (120), à l'anthocyanne morinidine (Pentahydroxy-3-5-7-2'-4'-flavylium) par oxydation en milieu alcalin suivie d'acidification. A ce composé a été attribuée la formule suivante, où un pont supplémentaire existe entre le phényle latéral et l'hétérocycle :



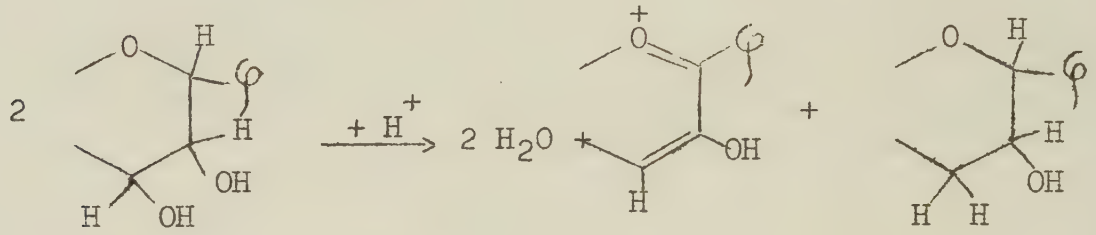
(Voir aussi (12) et (46)).

Une conception assez voisine est adoptée par FORSYTH et coll. (121) pour le peltogynol, déjà étudié par les ROBINSON(12) à partir de Peltogyne porphyrocardia :

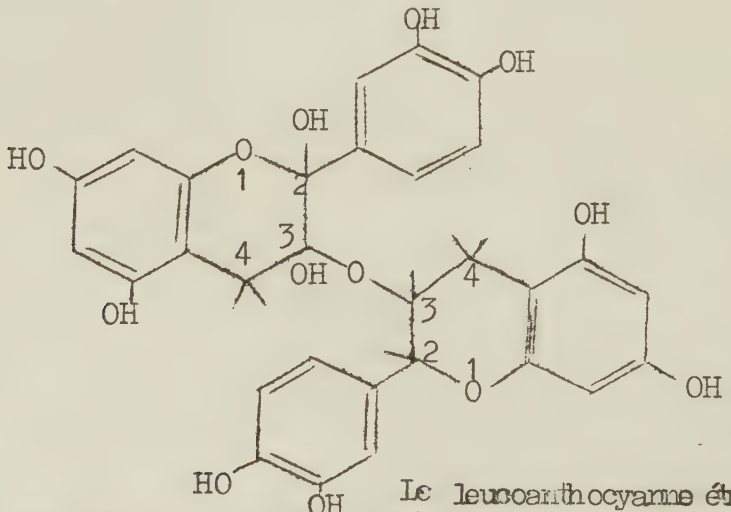


Ce leucoanthocyanne, qui possède d'ailleurs également trois carbones asymétriques, pourrait se présenter sous plusieurs formes stéréoisomères et dériver biogénétiquement d'un diol "classique" par condensation avec un reste de type formaldéhydique.

Un autre produit naturel enfin, la "leucocyanidine" du cacao, a donné lieu à certaines controverses structurales : en 1953 en effet, FORSYTH (35) observait que ce leucodérivé donne , par l'habituel traitement chlorhydrique à chaud, à côté de la cyanidine normalement attendue, une quantité importante de (-)épi catéchine. Parmi les hypothèses alors avancées, notons que KING et BOTTOMLEY (36) voyaient dans la catéchine ainsi produite un artéfact résultant d'une dismutation de la leucocyanidine lors de sa transformation en anthocyanne :

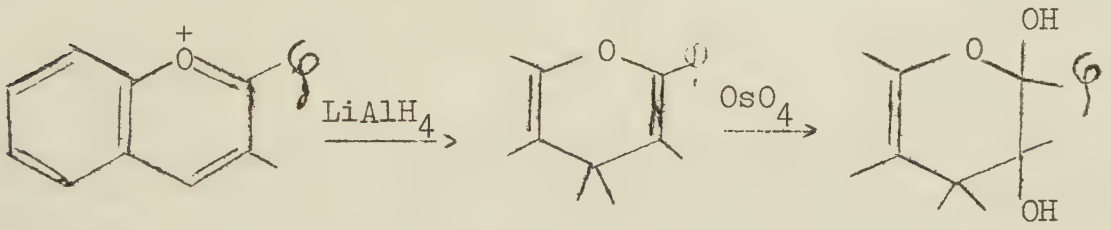


et l'on rejoint là l'important problème de l'oxydation, dont la nécessité a été depuis lors démontrée. Les derniers résultats de FORSYTH (122) montrent en fait que le leucodérivé de Theobroma cacao est un dimère de la (-)épi-catéchine et d'un diol dont il faut souligner la structure 2-3 et non 3-4 :

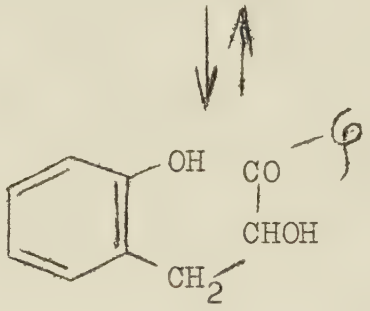


Le leucoanthocyanne étudié par WILLIAMS et coll.(81) possède vraisemblablement la même structure, son comportement chromatographique étant identique à celui du leucodérivé de FORSYTH (voir (29)).

Parallèlement à cette dernière thèse, qui s'éloigne assez nettement des données classiques, notons toutefois que la synthèse de dihydroxy-2-3-flavannes a été récemment réalisée (123): GRAMSHAW, JOHNSON et T.J. KING, réduisant les anthocyannes particuliers (absence d'hydroxyle en 3) que sont la lutéolidine (Tétrahydroxy-5-7-3'-4'-flavylium) et l'apigénidine (Trihydroxy-5-7-4'-flavylium) obtiennent les flav-ènes-2 correspondants ; l'hydroxylation de ces composés leur permet d'aboutir ensuite aux 2-3-diols, existant en fait de manière prépondérante sous la forme de dihydroxy-α-2-dihydrochalcones :



Ces derniers composés; traités par HCl à chaud dans l'isopropanol, conduisent aux anthocyannes correspondants (hydroxylés en 3), tout comme des leucodérivés typiques.



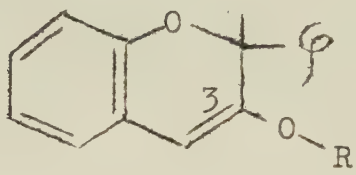
Enfin l'étude du mécanisme de la réduction des flavonols en anthocyannes a conduit certains auteurs à formuler diverses hypothèses sur les composés intermédiaires obtenus.

BAUER et coll.(106) avancent l'existence de dihydroxy-3-4-flav-ènes-2 (*); de tels composés sont également postulés par MIRZA et ROBINSON (124) dès 1950, ainsi que plus récemment par H.G.C. KING et WHITE (125). Ces produits de réduction ne semblent pas pouvoir cependant être considérés comme des constituants des leucoanthocyannes, surtout naturels; toutefois SESHADRI (62) pense que les produits de l'acétylation réductrice des flavonols, comme l'ont effectué KING et WHITE (125), sont plutôt des hydroxy-3-flav-ènes-3; il leur accorde de plus la dénomination de leucoanthocyannes, car ils peuvent être obtenus également par acétyla-

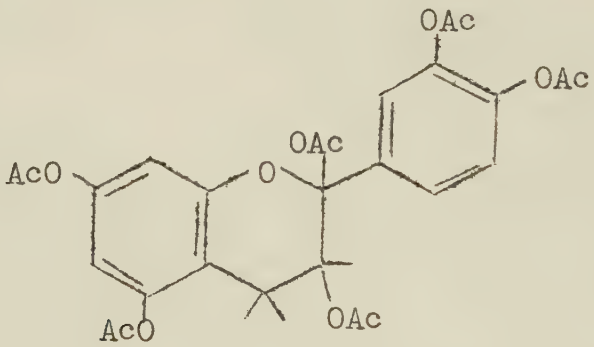
---

(*) Pour les mêmes auteurs, la transformation des leucodérivés en anthocyannes se ferait d'abord par déshydratation en 3-4 donnant un hydroxy-3-flav-ène-3, transformé ultérieurement en anthocyanne par oxydation.

tion de leucodérivés. Des composés apparemment identiques, incolores, semblent avoir été antérieurement obtenus par réduction des anthocyannes, sous forme libre (126) ou méthylée en 3 (127) :



FREUDENBERG (46) par contre, mentionne que le composé synthétisé dès 1935 (128) par réduction de l'hexaacétate de cyanidine, s'il est bien un isomère de la leucocyanidine hexaacétylée, en diffère par sa structure et ses propriétés:

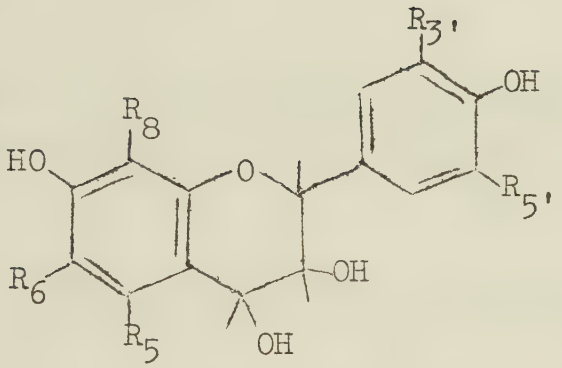


1.6. Systématique des leucoanthocyannes naturels.

1.6.1. Formes connues; distribution.

Si on les compare aux flavones et flavonols notamment, les leucoanthocyannes naturels actuellement connus sont relativement peu nombreux; FREUDENBERG (51) en a donné tout récemment une liste assez complète :

Sous réserve des exceptions structurales précédemment signalées, tous les leucodérivés possèdent le squelette tétrahydroxy-3-4-7-4'-flavanne; par degré d'hydroxylation croissant ont été signalés :



- La guibourtacacidine (129), Guibourtia sp. seule source connue:

$R_5=R_6=R_8=R_{3'}=R_{5'}=$ -H.

- La leucofisétinidine (43,45,46,75,76,92,96,98,108,129) ou gléditsine (73) ou mollisacacidine (68,70) :

$R_5=R_6=R_8=R_{5'}=$ -H, $R_{3'}=$ -OH.

- La leucopélargonidine (50,61,84,87,93) :

$R_6=R_8=R_{3'}=R_{5'}=$ -H, $R_5=$ -OH.

- La téracacidine (51):

$R_5=R_6=R_{3'}=R_{5'}=$ -H, $R_8=$ -OH.

- La leucocyanidine, leucodérivé de loin le plus répandu (voir p.ex. (25,28)):

$R_6=R_8=R_{5'}=$ -H, $R_5=R_{3'}=$ -OH.

- La leucorobinétinidine (47,50,76) :

$R_5=R_6=R_8=$ -H, $R_{3'}=R_{5'}=$ -OH.

- La mélacacidine (36-40,76,86,87) :

$R_5=R_6=R_{5'}=$ -H, $R_8=R_{3'}=$ -OH.

- La leucodelphinidine, le leucoanthocyanne le plus répandu après la leucocyanidine (25,28):

$R_6=R_8=$ -H, $R_5=R_{3'}=R_5=$ -OH.

Un seul leucoanthocyanne méthylé est connu, non isolé et assez peu fréquent d'ailleurs :
- la leucopaeonidine (25,69,105,130), analogue méthylé en 3' de la leucocyanidine.

Ces diverses substitutions du squelette leucoanthocyanique rapprochent les leucodérivés des catéchines, moins nombreuses encore cependant.

Seules sont connues avec certitude dans la nature à l'état monomère les catéchines(stricto sensu), forme la plus répandue, homologues de la leucocyanidine; les gallocatéchines correspondant à la leucodelphinidine; l'afzéléchine, analogue de la leucopélargonidine, dont la distribution est limitée à Afzelia sp.; enfin l'homologue de la leucorobinétinidine, isolée d'Acacia sp. (131).

Des anthocyannes par contre, les leucodérivés (tout comme les catéchines -sensu lato -d'ailleurs, bien que l'existence d'un glucoside en 3 de la (-)épi-catéchine dans Gleditschia triacanthos ait été avancée (132)) se différencient par deux faits essentiels: absence presque générale de dérivés méthylés, existence naturelle très probable sous forme d'aglycones le plus souvent (*). Quelques arguments ont bien été apportés en faveur de la présence d'hétérosides de leucoanthocyannes (82,91,96,123,134), mais sans isolement des produits correspondants.

L'examen de plusieurs centaines d'espèces végétales a permis à BATE-SMITH et LERNER (25,26,28) d'étudier l'aspect taxonomique de la distribution des leucoanthocyannes; comme le note ERDTMAN (135) qui sous le même angle a étudié les composés flavoniques des conifères, la chimie semble capable d'apporter sa contribution à la résolution des problèmes phylogénétiques, ceci d'autant plus que ses méthodes se différencient totalement des critères botaniques classiques.

Des résultats de BATE-SMITH se dégagent les principales conclusions suivantes :

- Il existe une nette relation entre la distribution des leucodérivés dans une plante et la position systématique de celle-ci: les leucoanthocyannes sont absents des Bryophytes, présents (Filicinées) ou absents (Lycopodinées) chez les Cryptogames vasculaires, plus répandus chez les Phanérogames.

- Les leucodérivés sont généralement présents chez les Gymnospermes, conifères en particulier. Parmi les Angiospermes, la distribution atteint le tiers des Monocotylédones examinées ; chez

---

(*) Notons toutefois que la technique de détection chlorhydrique des leucoanthocyannes ne saurait apporter de renseignements à ce sujet.

les Dicotylédones, une intéressante corrélation apparaît avec la classification de HUTCHINSON (136) en deux groupes: Lignosae et Herbacae (*); 61 % des espèces ligneuses contiennent des leucoanthocyannes (encore la majorité des espèces déficientes est-elle quelque peu en marge systématique de ce groupe), contre 15 % seulement pour les plantes herbacées.

- La distribution des leucodérivés a été plus particulièrement étudiée chez les Papilionacées; cette famille a été divisée en effet par DORMER (138) en deux groupes morphologiques caractérisés par la présence ou l'absence d'un pulvinus à la base des feuilles. Cette distinction se trouve bien recoupée par la présence ou l'absence de leucoanthocyannes.

- Enfin, la présence des leucodérivés paraît être également reliée au caractère "primitif" d'une famille ou d'une espèce, c'est-à-dire à son degré d'évolution, indépendamment de sa nature ligneuse ou herbacée.

1.6.2. Physiologie et métabolisme; applications industrielles.

Il apparaît utile d'envisager maintenant le rôle tenu par les leucoanthocyannes dans la cellule vivante, ainsi que de mentionner les diverses applications pratiques auxquelles ont donné lieu les résultats acquis, dans divers domaines industriels en particulier. Nous laisserons ici de côté l'aspect différent de la physiologie animale, et notamment le problème des propriétés vitaminiques P des leucodérivés.

D'après quelques résultats (139), les leucoanthocyannes pourraient avoir un rôle indicateur ou protecteur à l'égard des virus végétaux; ceci est sans doute à rapprocher du pouvoir antiseptique attribué aux tanins. Un peu mieux défini paraît être le pouvoir mitotique des leucodérivés: SHANTZ et STEWARD (134) ont montré qu'un composé leucoanthocyanique extrait de Aesculus sp. se comporte comme un facteur de croissance, à la dose de 20 p.p.m., pour des cultures de tissus végétaux dont il active la division cellulaire. HILLIS (86) a noté des faits comparables pour le cambium d'eucalyptus; cet auteur fait de plus remarquer que les leucodérivés, flavonoïdes à large distribution, ont probablement un rôle cellulaire particulier dans les phénomènes d'oxydoréduction et de respiration (auquel les propriétés de la fonction diol ne sont certainement pas étrangères). Ainsi, dans le houblon, seule plante herbacée étudiée sous l'angle métabolique, les variations saisonnières de teneur des leucoanthocyannes et de l'acide ascorbique sont-ils en étroite relation (140).

La congruence généralement relevée entre le caractère ligneux d'une espèce et la présence de leucodérivés semblerait

---

(*) Ou même avec celle, moins discutée, de METCALFE et CHALK (137) où les familles de Dicotylédones sont divisées en cinq groupes, de "totalement ligneux" à "totalement herbacé"(D'après(28)).

impliquer un rôle de ces derniers dans les processus de lignifications; BATE-SMITH (25) note cependant que le squelette lignine C_3-C'_6 comporte le plus souvent des méthylations en 3' et 5', absentes chez les leucoanthocyannes; d'autre part, maintes plantes ligneuses sont dépourvues de leucodérivés, mais d'autres molécules, coumarines en particulier, pourraient alors tenir ce rôle éventuel.

Le caractère des leucoanthocyannes comme précurseurs naturels des anthocyannes est également discuté, bien que la facilité de cette transformation in vitro ait très tôt suggéré cette hypothèse (3,7,8,13,141). ROBINSON et coll. (16) ont montré que les anthocyannes des fleurs de Lathyrus odoratus préexistent dans les graines sous forme des leucodérivés correspondants, mais plusieurs faits expérimentaux semblent interdire la généralisation de cette transformation: distribution plus large des leucoanthocyannes, existence de leucodérivés dont l'anthocyanne homologue est inconnu in natura (mélacacidine p.ex.), existence des anthocyannes sous forme exclusivement hétérosidique et fréquemment méthylée (*). RUTZLER et coll. (17) estiment cependant que les leucoanthocyannes sont dans plusieurs cas (au moins 12 espèces sur 86) des précurseurs probables des colorations automnales rouges, mais ces résultats sont critiqués par les ROBINSON (15). De telles conclusions, basées le plus souvent sur la coexistence du leucodérivé et de l'anthocyanne correspondants, et sur la manifestation d'un antagonisme dynamique de leurs teneurs, ont également été avancées par SIMMONDS (142) pour la biogénèse des anthocyannes des bananes et par ALSTON et HAGEN (143) pour Impatiens balsamina.

D'autres hypothèses ont été émises sur les interrelations biogénétiques des leucoanthocyannes et des flavonols (86,144,145); on touche là en fait au problème important et plus général de la biogénèse flavonique (voir p.ex.(146)). Pour les leucodérivés plus encore peut-être que pour tout autre flavonoïde, les données précises font défaut et, vraisemblablement, seul l'emploi du radiocarbone (voir p.ex. (147)) permettra de vérifier ou d'infirmer les théories que peuvent suggérer les résultats purement chimiques, descriptifs ou même dynamiques.

CRONENBERGER et coll. (148) ont montré que la synthèse des leucoanthocyannes peut s'effectuer dans des cultures de tissus de vigne-vierge, c'est-à-dire indépendamment de mécanismes photosynthétiques. Le même auteur (105) a étudié les variations saisonnières de la leucocyanidine dans les feuilles de différents Prunus: la teneur passe par un maximum situé au début du mois de Juillet. De même HILLIS et SWAIN (104) ont noté un maximum en milieu de saison pour la teneur des leucodérivés du prûnier. (Le genre Prunus a été très étudié sous l'angle flavonique, et leucoanthocyanique en particulier (149,150)); la synthèse et le métabolisme

---

(*) Mais, comme d'ailleurs dans le cas de la lignine, la méthylation (et la glycosidification) pourrait s'effectuer ultérieurement à la réaction de filiation; de tels arguments ne paraissent donc pas absolument démonstratifs.

des leucoanthocyannes paraissent être sous l'influence directe de l'illumination. HILLIS (86) a étudié plusieurs eucalyptus ; la teneur en leucodérivés des feuilles, de l'écorce et du cambium décroît pendant l'évolution saisonnière; le bois de coeur est environ deux fois plus riche que ne l'est l'aubier.

Une des applications industrielles auxquelles ont donné lieu les connaissances acquises sur la chimie des leucoanthocyannes concerne plus particulièrement le domaine de la tannerie; l'aspect fondamental de ce problème a été précédemment évoqué (v.s. 1.3.2. in fine). Sur le plan pratique, on doit noter que les leucodérivés présentent, à côté de leur pouvoir tannant et de l'abondance de leurs sources naturelles, certains inconvénients comme une astringence trop prononcée et une tendance à communiquer aux cuirs traités une coloration rougeâtre (84,86); l'industrie papetière est également intéressée par ce dernier aspect du problème.

La valorisation des ressources naturelles a été tout spécialement envisagée par divers organismes de la Communauté britannique : tanins d'eucalyptus et d'acacias (HILLIS (84,86,87, 93),Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australie); tanins d'acacias et de québracho (ROUX (75,76,91,92), Leather Industries Research Institute, Afrique du Sud) (H.G.C.KING et WHITE (95-98), Forestal Central Laboratories, Grande-Bretagne); tanins de l'écorce de chêne (HATHWAY (82), British Leather Manufacturer's Research Association).

Notons enfin qu'un débouché particulier pourrait être envisagé pour les leucoanthocyannes: LAUMAS et SESHADRI (60) ont observé que leur polymérisation en présence d'aldéhydes conduit à la formation de substances plastiques.

Le "British Way of Life" a également fortement marqué de son empreinte les recherches conduites dans le domaine des industries alimentaires. Sous l'angle des propriétés organoleptiques en particulier (27), notons: études sur les leucodérivés (et catéchines) du thé (ROBERTS (78,79,152), Indian Tea Association); sur les polyphénols du cacao et leur évolution au cours de la fermentation préparative (FORSYTH (31-33,35), Colonial Microbiological Research Institute, Trinité); sur les tanins du cidre et du poiré (80,81); dans le domaine brassicole (Brewing Industry Research Foundation (v.i. 2.1.)). La note "latine" a été apportée par les études de RIBEREAU-GAYON sur les leucoanthocyannes de la vigne (130) et du vin (69). L'évolution des leucodérivés au cours de la maturation des bananes a fait également l'objet de quelques recherches (142,153).

Telles sont les principales données concernant l'analyse, la structure et les propriétés des leucoanthocyannes; la diversité

et l'ampleur des domaines chimiques, biochimiques et industriels que nous avons été amené à évoquer à cette occasion, montrent combien ces composés, derniers venus parmi les "espèces" du "genre" flavonique, ont pris désormais une place de tout premier plan, voire de carrefour, dans la chimie des flavonoïdes.

---

2. LES LEUCOANTHOCYANNES du HOUBLON

2.1. Le Tanin du houblon; étude bibliographique.

Plus qu'à une définition d'ordre structural, c'est à l'énumération d'un ensemble de propriétés qu'il faut faire appel pour définir les tanins; on groupe sous ce nom les composés naturels non-azotés possédant les caractères dûs à la présence de nombreux groupements hydroxyles, généralement phénoliques:

astringence, hygroscopicité, propriété de solubilité dans les solvants oxygénés, adsorption avec les protéines et certaines bases organiques, réactions de coloration ou de précipitation avec certains cations, propriétés réductrices, masse moléculaire généralement élevée due à des phénomènes de condensation ou de polymérisation.

Les travaux conduits principalement pendant le premier tiers de ce siècle, ont permis de classer les tanins en deux groupes principaux:

- les tanins galliques résultent de l'estérification d'un ose par l'acide gallique ou l'un de ses dérivés; l'hydrolyse acide scinde ces tanins, de masse moléculaire moyenne, en leurs constituants phénolique et osidique.

- les tanins catéchiques (ou tanins condensés ou phlobatanins), possèdent le squelette phényl-2-chromanne plus complexe des flavanoïdes; ils sont dits également non-hydrolysables car l'action des acides conduit aux phlobaphènes, produits de dégradation mal définis. Seule la fusion alcaline permet de saisir des produits de coupure et d'en déduire la structure de ces tanins, dont on admet qu'ils sont constitués du mélange des produits de condensation de catéchines élémentaires. Nous avons vu que les récentes données de la chimie des leucoanthocyannes font de ces composés des constituants des tanins, au même titre que les catéchines; la dénomination de tanins flavaniques semblerait donc actuellement plus apte à définir ce groupe.

Plus encore que précédemment, il nous paraît difficile de définir le tanin du houblon, à partir des données de la littérature, autrement que par ses caractères et ses propriétés; la liste serait longue cependant, des travaux techniques qui, depuis plus d'un siècle, se sont attachés à définir son rôle dans l'ensemble des processus brassicoles, notamment dans l'important problème pratique que pose la stabilité colloïdale de la bière.

Parmi les recherches fondamentales, il convient de citer en premier lieu les résultats de ETTI (154): l'éthanol est l'agent d'extraction du tanin dont l'acétate de plomb assure l'isolement par précipitation suivie de régénération sulfhydrique. Le produit obtenu (formules brutes proposées) libère du glucose par hydrolyse acide, et de la phloroglucine et de l'acide protocatéchique par fusion alcaline; il est apte à donner des phlobaphènes par anhydrisation, ces derniers pouvant fournir à leur tour du glucose et des colorants rouges par action des acides. Toutes ces propriétés s'expliquent fort bien comme étant celles d'un mélange de glycosides flavoniques et de leucoanthocyannes, mais le manque de connaissances sur le sujet, inhérent à l'époque de ces recherches -1875-, empêcha évidemment leur auteur d'en tirer d'exactes conclusions.

Citons quelques travaux ultérieurs n'apportant d'ailleurs que peu d'informations supplémentaires (155,156), et notons que LABORDE(3), dès 1908, observait que le tanin du houblon, traité par HCl à chaud, donne une coloration rouge analogue à celle des raisins mûrs.

On parvient vers 1930 aux recherches de BILGRAM (157) qui, par précipitations alternées par l'acétate de plomb et la cinchonine, obtint un tanin pratiquement exempt de flavonols (0,4 % de glucose seulement), dont la fusion alcaline donne des résultats identiques à ceux de ETTI; BILGRAM soulignede plus l'extrême instabilité à l'air de ce produit, obtenu avec un rendement d'extraction inférieur à un pour mille.

Par contre, NIERENSTEIN (158) tenta en vain d'extraire du houblon quelque composé du type catéchine, et HEINTZ (159), se livrant à la critique des tests utilisés en Brasserie, n'hésita pas à affirmer que le tanin du houblon n'existe pas.

Ces travaux, conduits peu après les recherches de BILGRAM, montrent à quel point abondent les controverses sur le sujet. Il faut bien reconnaître en effet que les résultats cités et les tests classiques des tanins ne présentent aucune sélectivité; à cette critique n'échappent pas les principaux modes de dosage du tanin du houblon (Voir p.ex. le traité de DE CLERCK (160)) : volumétrie permanganique après adsorption sur poudre de peau, gravimétrie à l'aide de cinchonine, néphélométrie du complexe obtenu avec des résines formol-urée, colorimétrie après réaction avec Fe^{3+} à pH 10. Les teneurs en tanin ainsi déterminées pour les cônes de houblon, souvent discordantes d'ailleurs, sont échelonnées de 2 à 5 % en poids sec.

C'est en fait d'une manière assez indirecte qu'allaient s'enrichir les connaissances sur le tanin du houblon, grâce aux résultats cités sur la structure et les propriétés des leucoanthocyannes. La démonstration de la présence de leucodérivés dans cette espèce végétale, due aux chercheurs de Nutfield (161), confirmée par BATE-SMITH (25), a été reprise à Louvain : VANCRAENENBROECK et LONTIE (162) se sont adressés aux techniques basées sur les équilibres de partage que constituent la chromatographie sur papier et

l'échange à contre-courant.McFARLANE, WYE et GRANT (163) ont noté que la cyanidine et la delphinidine sont les deux anthocyannes obtenus par traitement acide du houblon, et pensent que les graines du houblon sont particulièrement riches en un diglucoside de la cyanidine.

En 1956, HARRIS (164) publie ses premiers résultats sur l'étude des polyphénols du houblon, développement de la brève note de 1953 (161). Les composés identifiés, parmi plus de 70 constituants chromatographiquement distincts, peuvent se classer en quatre groupes :

- leucoanthocyannes (leucocyanidine et leucodelphinidine);
- glycosides de la quercétine;
- acides chlorogéniques;
- acides-phénols libres.

Ces données sont publiées simultanément à notre première note sur le rôle des leucodérivés comme tanins en Brasserie (165) , peu avant notre mise au point sur les tanins leucoanthocyaniques du houblon (71), où nous relevons la séparation chromatographique des leucodérivés des cônes en cinq constituants distincts, attribués à des stéréoisomères de la leucocyanidine et de la leucodelphinidine; leur condensation spontanée à l'air conduit à la formation de tanins décelables par leur comportement chromatographique particulier. Ces deux données importantes viennent de se trouver confirmées par de nouveaux résultats de HARRIS (166),selon qui les leucoanthocyannes seraient accompagnés par surcroît de (+)catéchine et d'épicatéchine.

2.2. Les leucoanthocyannes du houblon; partie expérimentale.

2.2.1. Analyse qualitative (v.s.1.4.1.)

Selon les techniques de BATE-SMITH (25), les leucodérivés sont analysés par l'intermédiaire des anthocyannes formés par action d'HCl 2N, au B.M. bouillant, sur quelques centaines de mg. de matériel végétal; après lavage à l'éther de l'hydrolysat, l'extrait butanolique est analysé par chromatographie monodimensionnelle sur papier; les résultats suivants sont obtenus :

	Valeurs de Rf dans le solvant		
	1	2	3
Composé A	0,32	0,55	0,32
Composé B	0,50 (*)	0,70	0,60

Solvant 1 : solvant "Forestal" : acide acétique.-eau.-HCl 11N:(30)-(10)-(3)

Solvant 2 : m-crésol.-acide acétique.-HCl 11N (2)-(2)-(1)

Solvant 3 : n-butanol saturé d'HCl 2N.

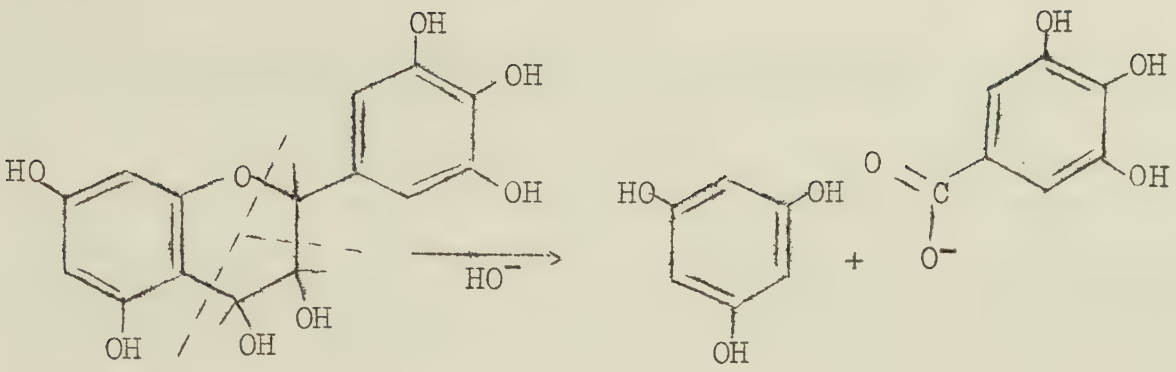
Comparées aux valeurs de la littérature, ces données permettent d'avancer la présence de leucodelphinidine et de leucocyanidine dans le houblon; les anthocyannes ainsi détectés ne préexistent pas dans le végétal, dont l'extraction par des solvants alcooliques légèrement acides, à froid, ne fournit qu'une coloration jaune-vert (Tout au plus certains houblons, de maturité avancée notamment, présentent-ils des bractées ou des tiges rougeâtres; les anthocyannes ainsi qualitativement détectés ne sauraient cependant représenter qu'une faible fraction des leucodérivés).

L'obtention des anthocyannes précités avec le degré de pureté élevé qu'exigent les analyses spectrales a été rendue possible par l'emploi de la chromatographie bidimensionnelle, préconisée par RIBEREAU-GAYON (103): solvant Forestal pour la première dimension, butanol chlorhydrique pour la seconde; la tache chromatographique est éluée par l'éthanol, et l'on recherche la position du maximum d'absorption dans le visible (**). Le composé A absorbe à 552 mμ ., le composé B à 546 mμ., valeurs en accord avec les données de la littérature; la présence de groupements o-dihydroxylés sur le noyau phényle latéral est prouvée par le déplacement du rouge vers le bleu que subit la coloration des deux anthocyannes par addition de chlorure d'aluminium en milieu neutre.

Des preuves supplémentaires sont apportées par l'emploi de la fusion alcaline à l'échelle microanalytique: la phloroglucine, l'acide protocatéchique et l'acide gallique sont identifiés dans les produits de dégradation des leucoanthocyannes du houblon.

(*) Sur certains chromatogrammes apparaissent des traces d'un troisième anthocyanne, de Rf 0,63, qui pourrait donc provenir de la leucopaeonidine.

(**) Spectrophomètre JOBIN-YVON, modèle Maroc.



Leucodelphinidine Phloroglucine Acide gallique

Composé	Valeurs de Rf dans le solvant		
	1	2	3
Phloroglucine	0,17	0,86	0,73
Acide p-OH-benzoïque	0,79	-	0,90
Acide protocatéchique	0,34	0,65	-
Acide gallique	0,09	-	-

Solvant 1 : solvant de BATE-SMITH (167) : m-crésol.-acide acétique.-eau : (50)-(2)-(48)

Solvant 2 : pyridine.-n-butanol.-eau saturée de NaCl(1)-(1)-(2) (168).

Solvant 3 : solvant de Partridge : n-butanol.-acide acétique.-eau: (40)-(10)-(50).

Les propriétés de révélation apportent également de précieuses informations, le jeu des divers critères combinés permettant toute identification sans ambiguïté :

Composé	Examen en lumière U.V.	Chlorure ferrique	Benzidine bisdiazotée	Pourpre de bromocrésol
Phloroglucine	-	-	rose	-
Acide p-OH-benzoïque	-	-	-	jaune
Acide protocatéchique	-	vert	-	jaune
Acide gallique	violet	bleu	-	jaune

Nous pouvons donc conclure à la présence de leucocyanidine et de leucodelphinidine dans le houblon.

2.2.2. Extraction; étude structurale.

Dans le but d'obtenir des informations plus directes sur la structure des leucodérivés du houblon, un extrait polyphénolique a été obtenu par la technique utilisée par FORSYTH (35) pour l'étude des catéchines et leucoanthocyannes de Theobroma cacao .

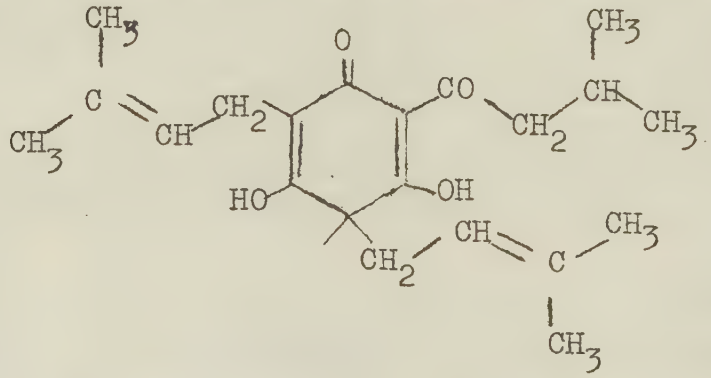
100 g. de cônes préalablement dérésinés (*) (par le benzène ou le chloroforme), sont traités à deux reprises au mixer par HCl N/10 maintenu à 0°C; après passage sur filtre Seitz, la solution limpide jaune d'or obtenue est saturée par NaCl, puis extraite à deux reprises par de l'acétate d'éthyle froid. Les extraits sont séchés et neutralisés, puis l'on concentre sous pression réduite d'azote jusqu'à début d'opalescence; l'addition de chloroforme provoque alors la précipitation de flocons jaunâtres; le rendement moyen d'extraction atteint 3 ‰ en poids sec.

Ce mélange polyphénolique complexe contient une fraction hétérosidique : l'hydrolyse acide libère en effet 5,6 % de glucose et 1,9 % de rhamnose, identifiés et dosés par chromatographie sur papier (planimétrie des pics d'absorption lumineuse, après révélation au phtalate d'aniline, et examen des chromatogrammes au lecteur de bandes). La présence de ces deux oses est à rapporter à l'existence de glycosides de flavonols, décelables dans la fraction "éther" des aglycones ainsi libérés (v.i. 3.1.).

La fraction leucoanthocyanique est la plus importante, constituant près de la moitié du mélange; son examen chromatographique est effectué à l'aide du système bidimensionnel utilisé par ROBERTS et WOOD (78) pour la séparation des isomères des catéchines

---

(*) Les "résines" du houblon sont un mélange complexe de composés tels que l'humulone, ou acide-amer α, et de leurs produits



Humulone

d'oxydation et de condensation; bien que de caractère lipophile, elles peuvent passer en suspension colloïdale dans les phases aqueuses, gênant toute recherche analytique ou préparative ultérieure.

de Thea sinensis; Fig. 1. L'aspect des chromatogrammes varie avec le laps de temps écoulé depuis l'obtention du mélange:

- Peu après l'extraction apparaissent cinq taches groupées, de faibles Rf, réagissant d'une manière identique, intense et immédiate, avec le nitrate d'argent ammoniacal et le ferricyanure ferrique, ne présentant pas de fluorescence en lumière U.V. et prenant une teinte rougeâtre par chauffage dans la vapeur d'eau bouillante après vaporisation d'éthanol chlorhydrique. Toutes ces propriétés indiquent la nature leucoanthocyanique des substances correspondantes; ces cinq taches chromatographiques ont été également observées par HARRIS (166) depuis notre première publication sur le sujet (71).

L'impossibilité de séparer en chromatographie monodimensionnelle (sur colonne) les substances responsables de ces taches nous a empêché d'en obtenir des quantités plus importantes permettant de nombreuses analyses détaillées; des informations indirectes peuvent cependant être obtenues sur la structure des leucodérivés correspondants:

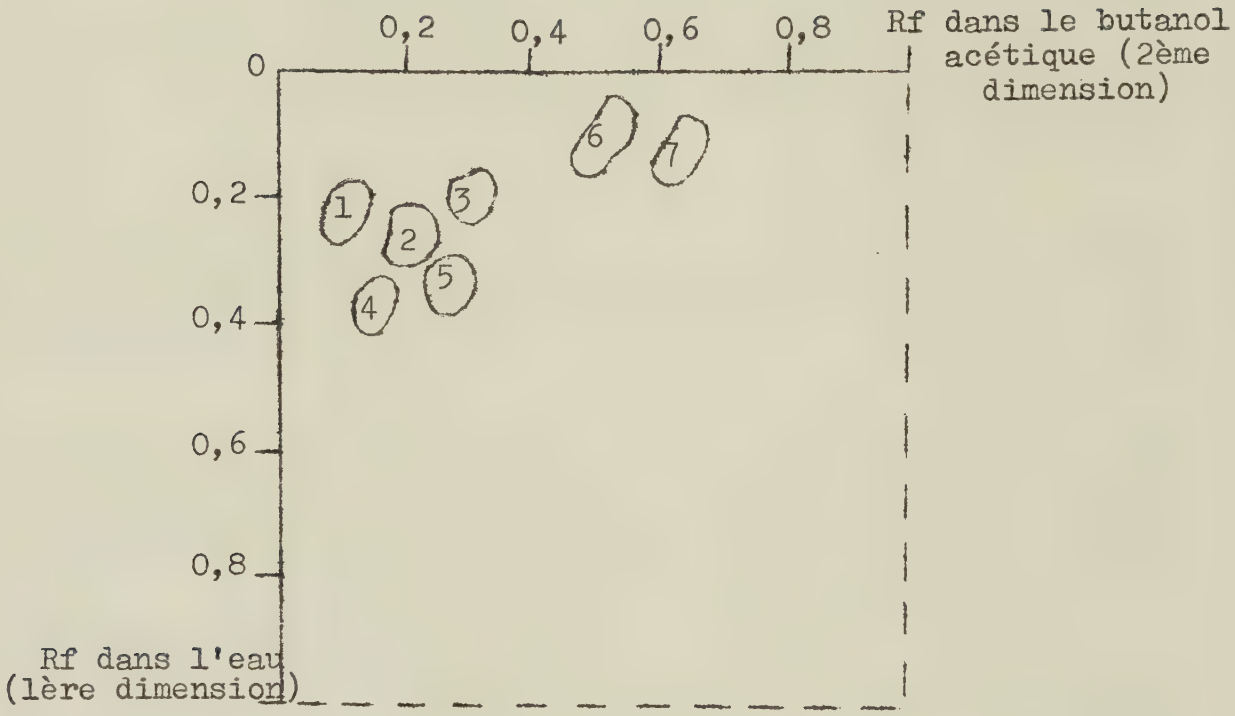
Les cinq composés leucoanthocyaniques chromatographiquement distincts - pour deux formules planes seulement - sont-ils des hétérosides ? La teneur glucidique totale relativement faible (7,5 %), comparée à celle des leucoanthocyannes (40 %) permet de rejeter cette hypothèse, d'autant plus que les flavonols signalés existent dans le mélange sous forme de glycosides.

La présence de ces cinq taches suggère donc plutôt la possibilité de l'existence de stéréoisomères des leucoanthocyannes du houblon, tout comme dans le cas général des catéchines. Les valeurs relativement faibles (inférieures à 0,4) des Rf sont en accord avec le nombre élevé de groupements hydroxyles; il est probable que la tache 1, la plus retenue par les phases stationnaires hydroxylées est constituée de leucodelphinidine (représentant 1/6 de la fraction leucoanthocyanique); ce point de vue a été confirmé par HARRIS (166), pour qui la tache 3 est due à de la leucocyanidine. Cet auteur émet de plus l'hypothèse que les autres taches puissent être dues à des "anthocyanogènes" différents des dihydroxy-3-4-flavannes.

- Après quelques jours ou semaines de conservation à l'air et à la température ordinaire, le mélange polyphénolique subit une évolution spontanée, particulièrement visible par examen chromatographique : les cinq taches précitées laissent place en effet, en tout ou partie, à une trainée continue de Rf 0 à 0,5 dans le solvant eau, demeurant sur la ligne de départ dans le solvant de Partridge. Les propriétés de révélation toujours nettes indiquent que de nombreux groupements hydroxyles demeurent intacts dans cette transformation; nous avons observé le même comportement pour la leucocyanidine extraite de Pinus maritima par MASQUELIER (21).

Ces propriétés chromatographiques s'interprètent comme provenant d'une polymérisation des leucoanthocyannes, extraits sous

Fig. 1



Comportement chromatographique de l'extrait polyphénolique des cônes de houblon(immédiatement après extraction).
(Représentation partielle).

la forme monomère initialement mise en évidence. Il est probable que des systèmes rédox particulièrement actifs protègent partiellement les leucodérivés de cette condensation dans la cellule végétale; ce rôle, qui pourrait être attribué in vivo à l'acide ascorbique notamment (v.i. 4.2.2.) se manifeste encore longtemps après la cueillette des cônes mûrs, puisque le houblon objet de nos recherches avait été stocké 18 mois (en chambre froide) avant extraction.

D'autres composés flavoniques peuvent être mis en évidence dans l'extrait polyphénolique : les taches 6 et 7 sont dues à des glycosides de flavonols (v.i. 3.1.), mais, à la limite de nos techniques opératoires (en l'absence notamment de témoins chromatographiques), il ne nous a pas été possible de mettre en évidence de catéchines. HARRIS toutefois, dans sa récente note (166), rapporte l'identification chromatographique de (+)catéchine et d'épicatéchine, bien que les premiers résultats de cet auteur (164) aient fourni des informations différentes.

2.2.3. Analyse quantitative

La réaction de formation d'anthocyannes sous l'action d'HCl à chaud est à nouveau utilisée, pour un dosage sensible et spécifique des leucodérivés totaux :

L'échantillon végétal broyé (0,1 à 1 g.poids sec, selon la teneur) est traité par 125 ml. d'HCl 2N, au B.M. bouillant, pendant 35 mn.; on filtre sur verre fritté n°3 et soumet le résidu à un second traitement. Les hydrolysats refroidis sont lavés (résines et aglycones flavoniques) à l'éther, puis les anthocyannes formés sont extraits à deux reprises par du n-butanol, pour un volume final de 50 ml. La densité optique de la solution butanolique, clarifiée par filtration sur papier, est mesurée sans attente au spectrophotomètre (*) à 550 m μ ., en cuve de 10 mm. d'épaisseur.

La reproductibilité des mesures est de l'ordre de $\pm$ 8 % sur trois essais, mais les conditions d'échantillonnage sont le facteur déterminant de la précision des résultats; il semble de plus difficile d'accorder aux chiffres obtenus une absolue représentativité de la teneur en leucoanthocyannes : la réaction d'hydrolyse oxydante des leucodérivés est loin d'être quantitative en effet, et l'influence du mode opératoire est primordiale sur la valeur de son rendement. Il est fort possible, de plus, que ce dernier soit affecté par le degré de polymérisation des leucodérivés ou par la nature des substituants du squelette dihydroxy-3-4-flavanique.

Un premier mode d'expression des résultats, relatif , consiste donc à traduire simplement les mesures en quantité d'anthocyannes formés, par l'intermédiaire du coefficient d'extinction molaire de la cyanidine, égal à 34.700.

(*) Beckmann, modèle D.U. (Ou à l'électrophotomètre Meunier, de Jobin-Yvon, filtre vert 55).

Une seconde présentation des valeurs obtenues consiste à traiter parallèlement aux dosages une gamme étalon de leucocyanidine (*) dont le rendement hydrolytique dans les conditions opératoires décrites, est très voisin de 7 %. Il est ainsi possible d'accéder à un ordre de grandeur, aussi proche que possible de la réalité, de la teneur en leucodérivés, exprimés comme leucocyanidine, compte-tenu du peu d'accessibilité et de stabilité des échantillons de référence. La fragilité des leucoanthocyannes et le peu de spécificité de leurs propriétés générales empêchent d'ailleurs de songer à tout dosage direct de la structure leucoanthocyanique, à l'exception de cas très particuliers, qu'il s'agisse de méthodes chromatographiques, de mesures spectrophotométriques U.V., ou de dosage par réactifs rédox. Il est possible de passer des résultats exprimés en mg. d'anthocyannes/g. de végétal aux résultats exprimés en % de leucodérivés à l'aide du facteur 1,44.

La courbe d'étalonnage présente pour les basses teneurs une légère concavité vers l'axe des abcisses, puis devient rectiligne ensuite. Pour une prise d'essai de 500 mg. de végétal, la sensibilité moyenne du dosage atteint 0,4 D.O./ 1 % de leucoanthocyannes.

Complément de ce dosage des leucodérivés totaux, l'appréciation de la proportion relative des deux leucoanthocyannes présents dans le houblon exige la discrimination des anthocyannes formés, par chromatographie sur papier (solvant Forestal). Le dépôt simultané de quantités variables du mélange à étudier fournit un étalonnage interne donnant une précision satisfaisante à l'appréciation visuelle des chromatogrammes; les résultats ainsi obtenus peuvent être précisés par l'utilisation d'un lecteur de bandes, éventuellement équipé d'un filtre vert, avec planimétrie des pics d'absorption lumineuse.

Les cônes mûrs de houblon contiennent en moyenne 2,1 % poids sec de leucodérivés totaux (dont 85 parties de leucocyanidine pour 15 de leucodelphinidine); ce chiffre élevé, comparé aux données de la littérature brassicole, montre que les leucoanthocyannes constituent bien la majeure partie des "tanins" du houblon.

(*) Nous avons utilisé dans ce but l'échantillon obligeamment fourni par Monsieur le Professeur MASQUELIER; la pureté de cette leucocyanidine est très voisine de 80 % ($E^{1\%}_{1cm.}$ = 144); son examen en diffraction R.X. montre d'ailleurs les raies caractéristiques du système cubique du chlorure de sodium, utilisé pour le relarguage préparatif du produit.

3. LES FLAVONOLS du HOUBLON

3.1. La quercétine et ses glycosides.

Voici un siècle déjà, la présence de quercétine dans le houblon était signalée (169); ce n'est cependant qu'au cours de ces dernières années qu'a été précisée la nature hétérosidique sous laquelle existe ce flavonol.

VANCRAENENBROECK et LONTIE (162) ont apporté des preuves spectrophotométriques et chromatographiques en faveur de la présence de quercitrine (rhamnosyl-3-quercétine); les mêmes techniques ont permis à UMEDA et KOSHIHARA (170) de prouver la présence d'isoquercitrine (glucosyl-3-quercétine) et de rutine (rhamnoglucosyl-3-quercétine) dans les cônes de houblon, puis à HARRIS (164) de confirmer les résultats des auteurs japonais.

Il nous a été également possible de démontrer l'existence de rutine, prédominante, dans le mélange complexe obtenu par précipitation par l'acétate neutre de plomb, à l'occasion de la recherche d'éventuels tanins galliques dans les cônes. Ayant observé qu'aucun solvant organique ne permet, à lui seul, d'obtenir la totalité des flavonoïdes, notre choix s'est porté plus simplement sur l'eau comme agent d'extraction, la précipitation par l'acétate de plomb pouvant être effectuée directement sur la solution obtenue; de plus, les résines (*) ayant échappé au traitement préalable par le benzène présentent ainsi une moindre tendance à perturber l'analyse.

Cinq macérations successives, à 35°C, sont nécessaires pour laisser dans le houblon résiduel moins de 5 % des substances précipitables par l'acétate de plomb (71); leur régénération sulfhydrique est effectuée dans l'éthanol et le sulfure de plomb éliminé par filtration. La gomme obtenue par évaporation du solvant (rendement d'extraction 1,1 %) a été étudiée par plusieurs techniques : en particulier, l'examen chromatographique de la fraction soluble dans l'acétate d'éthyle montre, comme précédemment (2.2.2.), la présence de deux taches (6 et 7, fig. 1) de fluorescence brun-jaune avivée en atmosphère ammoniacale.

(*) Les résines du houblon sont en effet précipitables par l'acétate de plomb.

Le constituant 6, plus abondant, a été étudié plus particulièrement : après élution par l'éthanol, la détermination de son spectre U.V. (*) indique l'existence de deux maxima à 258 et 360 mμ . et d'un minimum à 238 mμ ., caractéristiques d'un dérivé du type flavonol; le Rf non nul (0,1) dans le solvant eau prouve la nature glycosidique de ce composé; le Rf (0,52) dans le solvant de Partridge et le spectre U.V. sont en [illegible] ceux de la rutine. L'hydrolyse acide du mélange brut fournit d'ailleurs glucose et rhamnose.

La complexité des extraits polyphénoliques des cônes de houblon est toutefois telle, quel qu'en soit le mode d'obtention (162,164,71), que le dépouillement des chromatogrammes et la séparation, même purement analytique, des constituants, sont impossibles pour la majorité d'entre eux. Il nous est apparu par contre qu'une clarification importante des chromatogrammes flavoniques est obtenue par l'étude des aglycones , après hydrolyse chlorhydrique et extraction à l'éther; il devient même alors possible d'analyser directement les échantillons végétaux.

Le mélange ainsi obtenu est analysé par chromatographie monodimensionnelle sur papier, dans de nombreux solvants et en présence de composés de référence. La présence de quercétine, provenant des hétérosides précités, a pu être ainsi confirmée; les principales valeurs de Rf suivantes ont été relevées (Whatman n°1); on trouvera dans une récente mise au point de HARBORNE (171) l'ensemble des données chromatographiques concernant les aglycones flavoniques.

	Rf
1/ Solvant Forestal :	0,42
2/ Acide acétique 60 % :	0,32
3/ Solvant de Bate-Smith :	0,29
4/ Solvant de Partridge :	0,72
5/n-Butanol 75, acide formique 15, eau 10 :	0,67
6/m-Crésol saturé d'eau :	0,23
7/ Isopropanol 60 % :	0,7
8/n-Butanol saturé d'eau :	0,7
9 Acide acétique 30 % :	0,12 (trainée)

Les séparations chromatographiques peuvent être suivies d'élution par l'éthanol pour déterminations spectrophotométriques (172); le composé isolé absorbe à 257 et 375 mμ ., avec palier vers 305 mμ ., tout comme un témoin quercétine.

(*) Spectrophotomètre Unicam, modèle S.P. 500.

3.2. Le Kempférol

3.2.1. Essais préliminaires; papyrographie (*) comparée.

Sur les chromatogrammes de la fraction "éther" des aglycones apparaît un second composé, accompagnant la quercétine et présentant la même fluorescence jaune, avivée en atmosphère ammoniacale (**). L'étalonnage interne que fournit la présence de quercétine et l'application des règles reliant Rf et structure (notamment les remarques concernant l'augmentation du Rf avec l'abaissement du degré d'hydroxylation) permettent d'attribuer au composé inconnu la structure d'un flavonoïde tétrahydroxylé (ou tétrahydroxylé-n-méthoxylé); on effectue donc les examens chromatographiques des aglycones du houblon en présence des trois tétrahydroxyflavones suivantes :

- lutéoline : 5-7-3'-4'-OH (flavone) ;
- kempférol : 3-5-7-4' -OH (flavonol);
- fisétine : 3-7-3'-4'-OH (flavonol).

Les valeurs de Rf suivantes sont observées pour ces substances témoins :

	Lutéoline	Kempférol	Fisétine
1/ Solvant Forestal	0,64	0,60	0,53
2/ Acide acétique 60 %	0,50	0,45	0,40
3/ Solvant de Bate-Smith	0,70	0,65	0,46
4/ Solvant de Partridge	0,81	0,87	0,73
5/ Butanol formique	-	0,81	-
6/ m-Crésol saturé d'eau	0,66	0,64	0,49(***)
7/ Isopropanol 60 %	-	0,87	-
8/ n-Butanol saturé d'eau	-	0,85	-
9/ Acide acétique 30 %	-	0,15(tr.)	-

(*) =Chromatographie sur papier

(**) Sur certains chromatogrammes, la présence de traces d'un troisième flavonoïde a été provisoirement attribuée à de la myricétine (Hexahydroxy-3-5-7-3'-4'-5'-flavone).

(***) Notons que chez ces flavonoïdes isomères, l'absence d'un hydroxyle en 5 (fisétine) entraîne un net abaissement des Rf; le caractère plus hydrophile ainsi manifesté est sans doute dû à un "masquage" de l'-OH en 5 dans une liaison hydrogène avec le groupement carbonyle en 4 (v.i. 5.2.2.) chez les deux autres composés testés.

Le composé inconnu possède toutes les propriétés chromatographiques du kempférol, mais un très léger doute pourrait subsister en ce qui concerne la lutéoline, car la présence de cette flavone dans Humulus japonicus a été rapportée (173); toutefois la fluorescence de la lutéoline sur chromatogramme est brun-sombre, virant au jaune-brun en atmosphère ammoniacale. Il est par contre malheureusement impossible de pouvoir obtenir des données spectrales correctes par élution directe de la seconde substance flavonique du houblon, des traces résiduelles de résines interférant dans l'U.V. lointain.

Par conséquent, bien que la papyrographie comparée, effectuée selon un mode opératoire soigné (voir 167), donc reproductible, et à l'aide de solvants suffisamment variés nous paraisse être une méthode particulièrement riche et sûre, il importait de disposer du constituant "inconnu" en quantité et pureté suffisant à des déterminations analytiques plus diverses.

3.2.2. Démonstration de la présence du kempférol.

100g.de feuilles (*) dérésinées sont soumis, par petites fractions, à une double hydrolyse chlorhydrique; il importe d'effectuer la séparation de la phase aqueuse et du houblon résiduel aussi rapidement et à température aussi élevée que possible, afin d'éviter la rétention des aglycones, peu solubles. On procède ensuite à l'épuisement par l'éther des hydrolysats refroidis, évapore le solvant et redissout dans le minimum d'acide acétique glacial pour dépôt chromatographique.

La chromatographie monodimensionnelle sur papier peut certes permettre la séparation préparative des aglycones flavoniques; il convient pour cela d'effectuer le dépôt du mélange sous forme d'un trait continu couvrant toute la largeur du chromatogramme; mais la capacité d'une feuille en flavonol purifié est faible, de l'ordre du mg. ou moins, et il est nécessaire de multiplier le nombre des opérations pour accéder à des quantités pondérables de l'aglycone. Cette technique a permis à CRONENBERGER (105,174) l'obtention et l'étude du kempférol de Prunus avium .

D'une capacité supérieure, la chromatographie sur colonne de poudre de bois ou de cellulose peut être envisagée, mais l'on observe que le manque d'homogénéité d'un tel support ne permet pas l'analyse de mélanges trop complexes ou la séparation de composés de Rf trop voisins (distants de 0,2 Rf au minimum); d'autres

---

(*) Comme nous le verrons ci-dessous (4.1.1.), les feuilles de houblon contiennent également du kempférol, avec l'avantage d'une teneur en quercétine et en résines inférieure à celle des cônes.

supports tels que l'alumine conduisent à des adsorptions irréversibles et ne peuvent donc davantage être retenus. GEISSMANN (175) note d'ailleurs en substance que l'utilisation de colonnes chromatographiques pour la séparation et l'isolement des flavonoïdes en est restée surtout au stade potentiel; aucun matériau d'emploi général satisfaisant n'a été trouvé, et la séparation à l'échelle du mg. sur feuilles chromatographiques demeure actuellement la méthode la plus commode.

L'application au cas des aglycones flavoniques d'une technique particulière de la chromatographie de partage sur colonne de cellulose nous a cependant permis de résoudre avec succès le problème que constitue l'obtention, en une ou deux opérations seulement, de quantités de flavonols de l'ordre de plusieurs dizaines de mg. La méthode proposée par DANIELSON (176,177) et matérialisée par la firme L.K.B. (Stockholm)(*) consiste à employer comme support chromatographique une feuille de papier de très grande longueur, enroulée sur elle-même autour d'un coeur en polyéthylène; afin de maintenir la compacité de la colonne ainsi réalisée (notamment pour empêcher tout écoulement libre du solvant entre deux épaisseurs successives du papier), quel que soit le degré de gonflement de la cellulose (variable avec la nature et la concentration du solvant), une pression latérale réglable peut être appliquée.

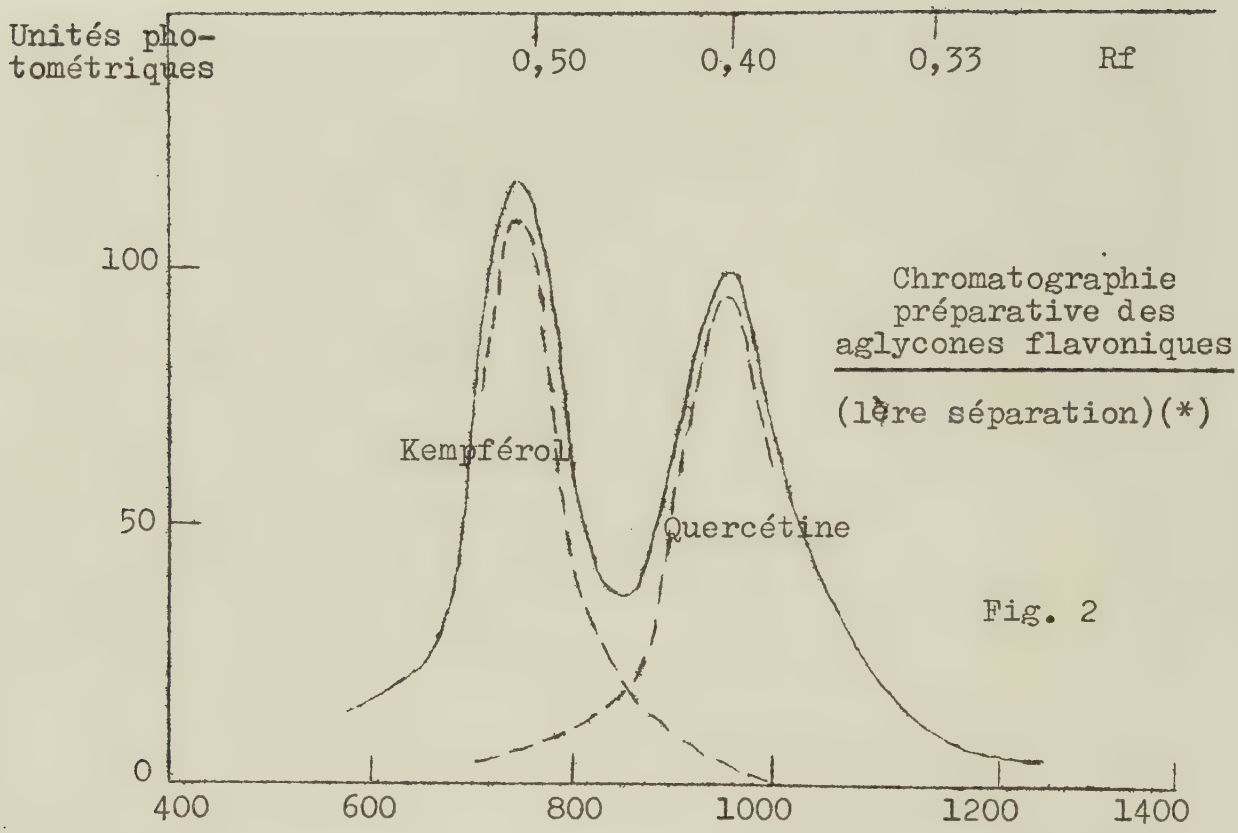
Les principaux avantages de la technique sont les suivants:

- parfaite homogénéité et isotropie du support chromatographique, d'où haut pouvoir de résolution;
- capacité élevée et possibilité de régénérations;
- données de la papyrographie analytique directement extrapolables à la chromatographie préparative (**).

Dans le cas très favorable d'un solvant monophase, comme l'acide acétique 60 % choisi pour la séparation des flavonols, la colonne se trouve régénérée dès l'achèvement de l'élution, d'où une appréciable économie de temps et de solvant. La figure 2 résume les différents paramètres expérimentaux et les résultats obtenus dans la séparation d'un mélange synthétique de 30 mg. de quercétine et de 30 mg. de kempférol, de Rf respectifs 0,32 et 0,45 (**).

(*) Commercialisée en France par Jarre-Jacquin (Paris).

(**) Les valeurs de Rf sont légèrement augmentées sur colonne par rapport aux données analytiques.



Chromatographie préparative des aglycones flavoniques

(1ère séparation)(*)

Fig. 2

Chromatographie sur colonne de papier LKB Chromax 3500

Colonne :diamètre 58 mm.; hauteur 360 mm.
Poids de papier: 280 g. (Grycksbo n°3, 70 $g.m^{-2}$)
Volume libre de colonne: 385 ml.
Solvant: acide acétique 60 %.
Pression latérale d'homogénéisation: 320 $g.cm^{-2}$.
Echantillon: 30 mg. Kempférol + 30 mg. quercétine;
(quelques dizaines de mg. de kempférol + quelques centaines de mg.d'impuretés de Rf moyen 0,7-0,8)
Support d'échantillon: 10 ml.d'acide acétique glacial.
Débit d'élution: 1 $ml.mn^{-1}$.
Fractionnement:/10 ml.(405 gouttes au Collecteur électronique Paris-Labo).
Volume de rétention du kempférol: 750 ml.(Rf 0,51)
Fraction "kempférol" recueillie: 680-840 ml.
Durée globale d'une opération distincte: 24 h.

(*) Le tracé discontinu traduit la pureté des flavonols séparés, appréciée par chromatographie semi-quantitative sur papier des différentes fractions recueillies.

Même dans le cas de ces composés très voisins, il est possible d'obtenir, en deux opérations successives, les 2/3 du flavonol engagé, avec un degré de pureté voisin de 99 %.

La pureté du kempférol ainsi extrait des hydrolysats de houblon ne dépasse cependant pas 95 %, par suite de la présence de traces de résines que des essais ultérieurs, recristallisations notamment, n'ont pu éliminer (*); ce degré de pureté nous a permis néanmoins de réaliser avec succès plusieurs déterminations analytiques.

Le point de fusion, mesuré au microscope de Koffler, est voisin de 272°C (corr.) (les données de la littérature pour le kempférol sont échelonnées de 270 à 280°C); cette valeur relativement basse permet d'éliminer définitivement la lutéoline (320°C), tout comme la fisétine (330°C), la rhamnétine (300°C) (méthyl-7-quercétine) et l'isorhamnétine (305°C)(méthyl-3'-quercétine)(178). Le flavonol se présente sous forme d'étoiles à fines branches multiples, se transformant en plaquettes allongées vers 220°C.

Toutes les propriétés spectrales sont identiques à celles d'un témoin kempférol (Fig. 3) :

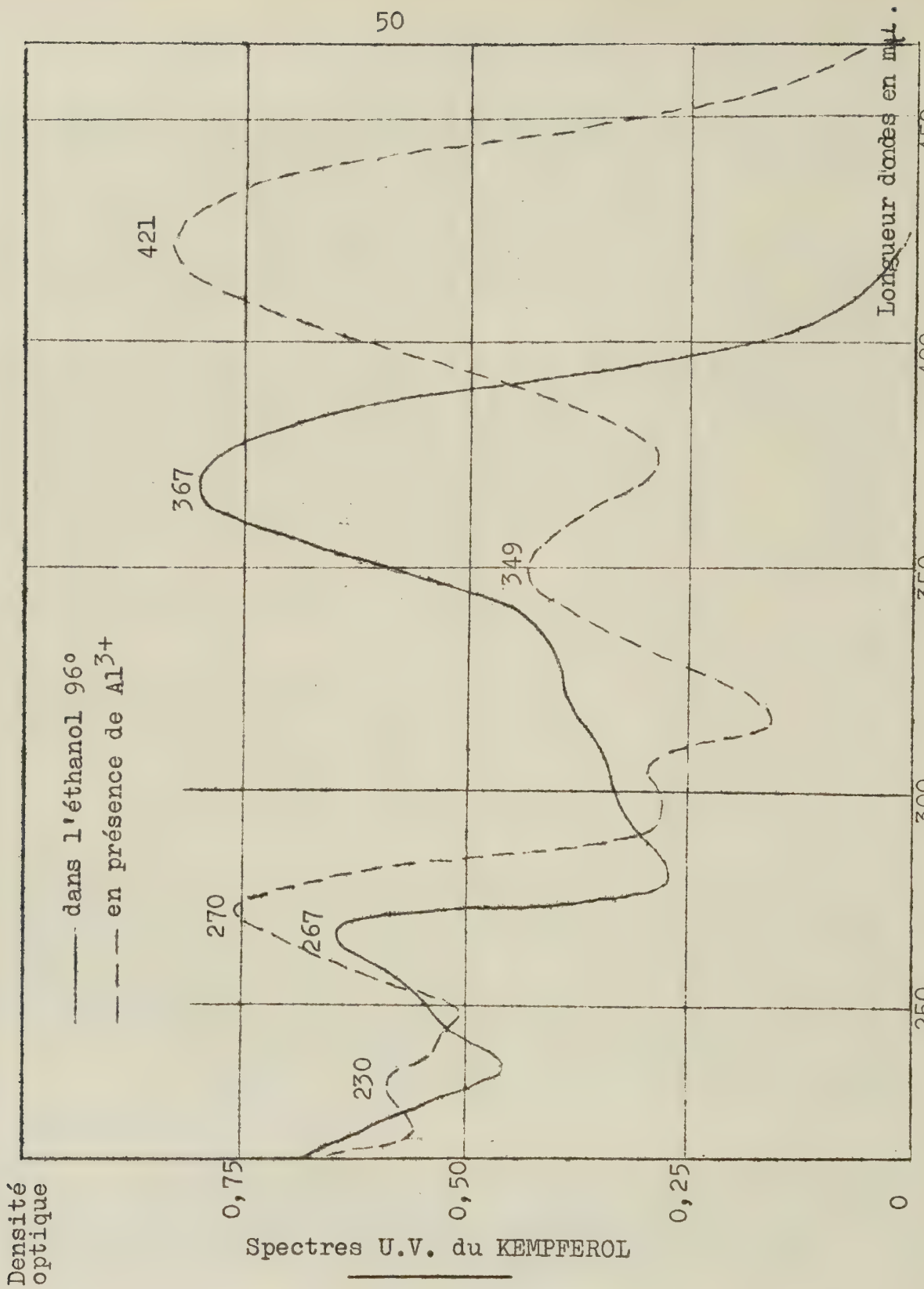
- en milieu éthanolique : maxima à 267 et 367 mμ., minima à 238 et 282 mμ.(**).
- en présence de Al^{3+} (solution de chlorure d'aluminium hexahydraté, à 0,45 % dans l'éthanol):
  maxima à 230, 270, (304), 349 et 421 mμ.,
  minima à 220, 246, (300), 316 et 373 mμ.

La détermination du spectre U.V. en milieu alcalin est particulièrement intéressante: il se manifeste en effet une rapide évolution que seul l'emploi d'un spectrophotomètre enregistreur (***)nous a permis de mettre pleinement en évidence (Fig.4) . JURD et HOROWITZ (181) ont noté que l'instabilité en milieu OH^- caractérise la présence de deux groupements hydroxyles libres en 3 et 4', tandis que ABBOT et coll. (182) ont observé que le spectre du kempférol en milieu bicarbonate subit une évolution avec point isobestique unique à 359 mμ .

(**) La lutéoline absorbe à 258 et 355 mμ.,(175,178); la fisétine de Gleditschia triacanthos présente trois maxima à 250,320 et 370 mμ. (179); L'isorhamnétine de Diplotaxis tenuifolia absorbe à 255 et 375 mμ . (180).

(***) Nous remercions Monsieur le Professeur COLONGE d'avoir bien voulu mettre cet appareil à notre disposition.

(*) Le mélange de départ contient 9 parties d'impuretés pour 1 de kempférol seulement, et les résines ont tendance à former une traînée continue sur les chromatogrammes.



Spectres U.V. du KEMPFEROL

Fig.3

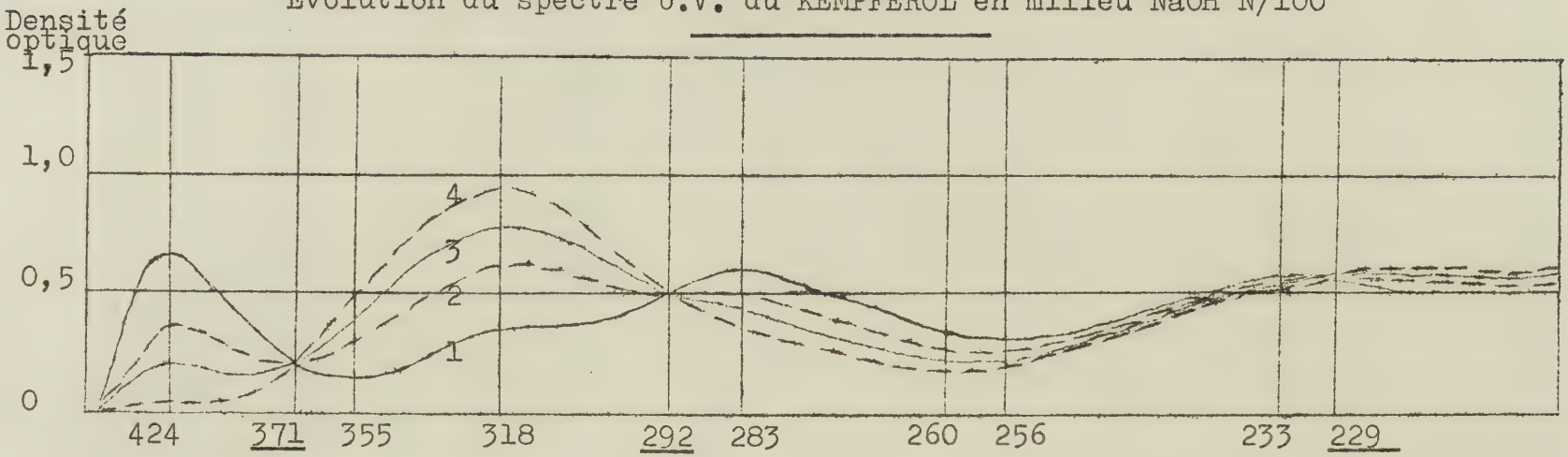
Mesuré dans les minutes suivant la constitution du mélange, le spectre du kempférol en milieu sodique N/100 présente trois maxima à 233, 283 et 424 mμ ., et trois minima à 225, 256 et 355 mμ. Une évolution rapide, de l'ordre d'une heure, conduit à l'affaiblissement des pics situés à 283 et 424 mμ . au profit d'un pic unique à 318 mμ .(apparaissant tout d'abord vers 312 mμ.). Dans cette transformation les minima situés à 256 et 355 mμ .subissent un effet bathochrome vers 260 et 375 mμ.(ce dernier avant de disparaître), et il se crée un minimum intermédiaire vers 300 mμ . Toutes ces transformations s'effectuent en laissant apparaître trois points isobestiques à 229, 292 et 371 mμ.; un tel phénomène implique la coexistence de deux structures moléculaires distinctes, et de deux tout au plus, ce qui incline à penser à une transposition (peut-être par ouverture de cycle), avec équilibre entre les deux formes, plus qu'à une dégradation.

Mais après un laps de temps supérieur, de l'ordre d'une journée, une seconde évolution se manifeste, où le pic situé à 318 mμ. se déplace à 326 mμ., tandis que réapparaît un second maximum à 285 mμ.; minima vers 302 et 250 mμ . Le spectre obtenu ne passe plus par les points isobestiques précités; la molécule a subi une transformation plus profonde, avec rupture de l'hétérocycle, car la papyrographie des produits de dégradation permet de mettre en évidence, dans le produit naturel comme dans l'échantillon de référence, de l'acide p-OH benzoïque (Le rendement d'obtention est faible, de l'ordre de quelques %, alors que ABBOT et coll. (182) ont recueilli 6 mg. de cet acide après dégradation de 25 mg. de kempférol en milieu bicarbonate). Il apparaît également (Rf 0,11 dans le solvant de Bate-Smith)un composé révélable en rose-violacé par la benzidine bis-diazotée, comme la phloroglucine (Rf 0,17) par conséquent; il est possible qu'il s'agisse de l'acide phloroglucine -carboxylique .

En dehors des possibilités analytiques qu'offre un spectre aux caractéristiques si diverses, cette évolution permet donc de dégrader la molécule du flavonol et de confirmer la nature des substituants de son noyau B; cette possibilité est d'autant plus précieuse que le kempférol ne se prête pas, ou très mal, à la microfusion alcaline (183), ce que nous avons pu vérifier dans le cas particulier du houblon (184). "Le comportement des divers dérivés flavoniques vis-à-vis de la fusion alcaline varie sensiblement en fonction de leur structure" (90).

Ainsi se trouve confirmée la présence du kempférol dans le houblon; il est à noter que les hétérosides de ce flavonol ne sont généralement pas précipités par l'acétate de plomb (175), ce qui, joint à sa plus grande accessibilité sous forme aglycone, peut contribuer à expliquer qu'il ait pû demeurer inaperçu des auteurs précités, malgré une abondance comparable à celle de la quercétine. Notons d'ailleurs que, selon BATE-SMITH (28), "il est inhabituel de rencontrer un seul flavonol dans un échantillon végétal".

Evolution du spectre U.V. du KEMPFEROL en milieu NaOH N/100

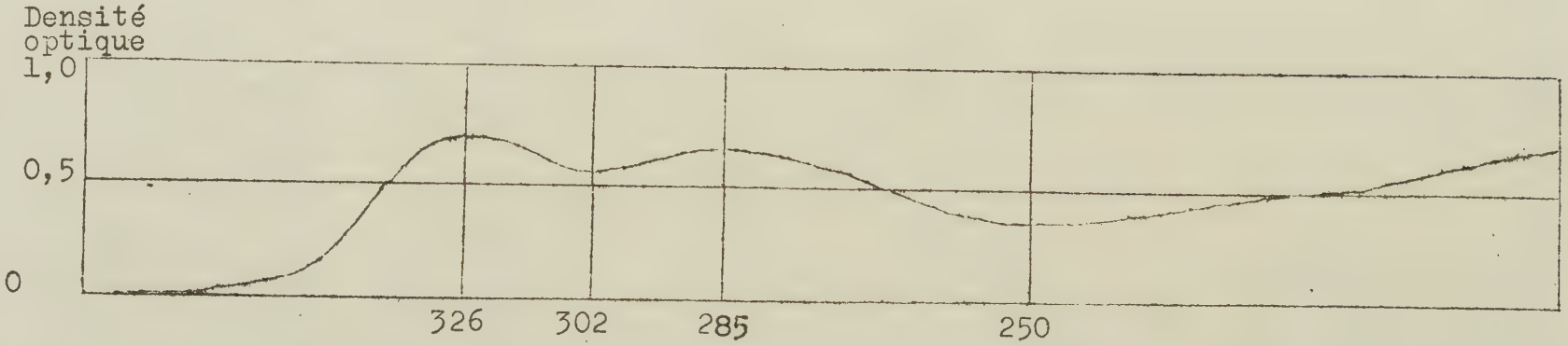


1: 3 mn. après mélange
2: 8 mn. " "
3: 13 mn. " "
4: 30 mn. " "

Longueur d'ondes en mμ.

Spectrophotomère LERES, modèle enregistreur T2D

Fig. 4



15 h. après mélange

Longueur d'ondes en mμ.

3.3. Dosage des flavonols.

Dans le but de disposer d'une méthode suffisamment spécifique et sensible, il est fait appel à l'emploi combiné de la chromatographie sur papier et de la spectrophotométrie U.V., selon la technique préconisée par CRONENBERGER (174) :

500 mg. poids sec de matériel végétal dérésiné et broyé sont traités par 125 ml. d'HCl 2N, au B.M. bouillant, pendant 35 mn.; on filtre à chaud sur verre fritté n°3 et soumet le houblon résiduel à une seconde hydrolyse. Les phases aqueuses refroidies sont alors extraites à trois reprises par l'éther, une fraction de celui-ci servant également à laver le végétal retenu sur filtre. Après évaporation du solvant, le résidu séché est repris par 1 ml. d'éthanol 96°; de cette solution, on effectue un dépôt de 100 mm^3, sous forme d'un trait de 10 cm., sur une feuille de papier chromatographique. Le support utilisé est le papier Whatmann n°1 qui offre le double avantage, sur le W 2 par exemple, d'essais à blanc plus faibles et d'une rétention moindre à l'élution.

On développe le chromatogramme par l'acide acétique 60 % et, après séchage, les bandes correspondant à la quercétine et au kempférol sont délimitées par examen en lumière U.V., sans atmosphère d'ammoniaque. On élue les flavonols à trois reprises par de l'éthanol 80°, au B.M. bouillant, pendant 1/4 d'h.; les éluats réunis et filtrés sont ajustés à 25 ml.; on effectue la mesure de leur densité optique, en cuve de 10 mm. d'épaisseur, au spectrophotomètre de Beckmann, à 367 mμ . pour le kempférol et 375 mμ. pour la quercétine.

Des dépôts chromatographiques de 25 à 150 μg. des deux flavonols purs, traités dans les mêmes conditions, permettent d'étalonner la mesure; la courbe de dosage, très légèrement concave vers l'axe des ordonnées, présente une sensibilité de 0,1 D.O./1‰ de flavonol dans les conditions opératoires décrites. La dispersion et l'exactitude des résultats sont de l'ordre de ± 7 % sur une détermination isolée; on procède à un minimum de trois essais par échantillon. Il est à noter que les rapports kempférol/quercétine, échappant à certaines possibilités d'erreurs volumétriques, sont connus pour le moins avec autant d'exactitude que ne le sont les teneurs respectives des deux flavonols.

3.4. Autres flavonoïdes.

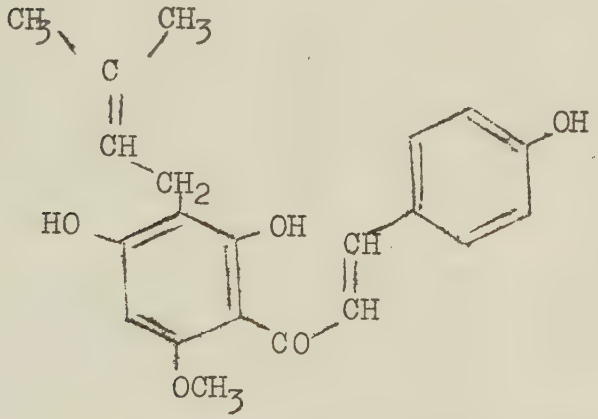
Du point de vue de l'oxydo-réduction de l'hétérocycle oxygéné, les flavanonols occupent une position intermédiaire entre les flavonols et les leucoanthocyannes; il était donc particulièrement important de rechercher leur présence éventuelle dans le houblon.

Nous avons utilisé dans ce but le test spécifique mis

au point par PACHECO et CHADENSON (185), basé sur l'aptitude des flavanonols à donner des composés possédant les propriétés générales des anthocyannes, par acétylation en présence d'acétate de sodium, suivie de désacétylation chlorhydrique. Dans les divers échantillons examinés(cônes,feuilles,tiges,et racines)et à deux périodes différentes du cycle annuel, nous n'avons pu mettre en évidence de flavanonols dans le houblon.

Il se pourrait pourtant que ces composés constituent des termes importants, mais fugaces, du métabolisme flavonique, leur concentration apparente étant pratiquement nulle par suite de l'existence de systèmes enzymatiques suffisamment actifs. Il importait d'envisager cette éventualité, et, dans ce but, des essais d'assimilation de taxifoline par de jeunes feuilles isolées maintenues sur milieu de Heller ont été conduits: aucune augmentation du taux de leucocyanidine ne se manifeste cependant; les flavanonols ne sont donc pas des intermédiaires du métabolisme flavonique du houblon.

Par ailleurs, la présence d'une chalcone a été brièvement rapportée par des auteurs belges (186):



Comme en témoigne sa formule, le xanthohumol présente une étroite parenté avec le kempférol (noyau B) et les résines du houblon (chaîne isoprénique fixée sur le noyau A), ce qui pourrait conduire à admettre une interrelation biogénétique de ces deux classes de composés.

Enfin, nous avons discuté précédemment (2.2.1. et.2.) de la présence éventuelle de petites quantités d'anthocyannes et de catéchines.

En conclusion, dans ses lignes générales, la distribution des flavonoïdes dans le houblon peut se résumer à quatre constituants essentiels :

- deux leucoanthocyannes, leucodelphinidine et leucocyanidine (aglycones);
- deux flavonols, quercétine et kempférol (hétérosides).

4. METABOLISME DES FLAVONOÏDES DU HOUBLON

4.1. Statique des flavonoïdes.

4.1.1. Selon la localisation dans la plante.

La distribution des quatre flavonoïdes dans le houblon ne se limite pas aux cônes, mais intéresse également les inflorescences, bourgeons et feuilles; partout ailleurs - tiges et racines - , leur teneur est très faible ou pratiquement nulle.

La teneur moyenne des cônes mûrs en leucoanthocyannes totaux est de 2,1 %, dont 85 parties de leucocyanidine pour 15 de leucodelphinidine seulement.

La teneur des feuilles en leucodérivés atteint plusieurs % , mais dépend de leur degré de développement (v.i. 4.2.1.); contrairement aux cônes, la proportion de leucodelphinidine, quoique variable, atteint des valeurs relativement élevées, 40 parties en moyenne pour 60 de leucocyanidine.

Les flavonols sont bien moins abondants: la teneur moyenne des aglycones totaux dans les feuilles est de 0,43 % poids sec, avec un rapport moyen kempférol/quercétine égal à 3 ; par contre, dans les cônes mûrs, la quercétine est environ trois fois plus abondante que ne l'est le kempférol.

4.1.2. Selon l'individualité du plant.

Il a été avancé que les composés flavoniques puissent jouer un rôle important dans les processus de la reproduction végétale : MOEWUS et DEULOFEU (187) ont noté une action inhibitrice de la rutine sur la fécondation de l'algue Chlamydomonas eugametos, activée au contraire par la présence d'ombuoside (Diméthyl-7-4'-rutine).

Le mode de reproduction du houblon est assez particulier: c'est en effet une plante dioïque, c'est-à-dire capable de se reproduire à partir des graines issues de la fécondation des plants ♀ par les plants ♂ ; le houblon est également une plante pérenne, car la partie aérienne, annuelle, se régénère à partir d'une souche persistante; il peut enfin se multiplier par boutures (188). Pour les houblons cultivés, le mode de multiplication par graines n'est utilisé que pour la recherche ou l'amélioration des variétés; la

fécondation des pieds ♀ est même évitée de façon courante dans les plantations, car la présence de graines entraîne une moins-value commerciale des cônes, due notamment à une modification du pouvoir amérisant des résines. Il convient donc d'éliminer les pieds ♂ des plantations, et une date précoce éviterait les immobilisations d'espace et les soins inutiles; et comme aucune particularité morphologique ne distingue les plants ♂ et ♀ avant la floraison, un test basé sur la distribution flavonique serait particulièrement précieux à cet égard. Les quatre flavonoïdes cités sont cependant présents dans les cônes mûrs -fécondés ou non- et fleurs, et surtout dans les feuilles des plants des deux sexes, en proportions relatives et absolues apparemment très voisines.

La situation est à peine moins défavorable en ce qui concerne une éventuelle distinction variétale: des houblons d'origines diverses, cultivés en Bourgogne, présentent les teneurs leucoanthocyaniques suivantes : 1,53-1,88-1,90-2,11-2,24-2,45-2,46 %, soit 2,08 % ± 25 % relatifs, alors que les teneurs en résines peuvent varier du simple au double selon les variétés.

L'influence du milieu est également faible; nous avons observé les valeurs suivantes (cônes mûrs) :

Houblons cultivés en Bourgogne : 2,08 %

Houblon cultivé en Bohême : 2,30 %

Houblon cultivé en Australie : 2,12 % en leucoanthocyannes totaux; cependant la proportion relative de leucodelphinidine semble un peu plus élevée dans les houblons australiens (25 % contre 15 %).

Résultat surprenant sous l'angle économique, les cônes mûrs de houblon sauvage présentent des teneurs en leucodérivés proches des valeurs précédentes : 1,80 %. Dans tous les échantillons, les deux leucoanthocyannes et les deux flavonols sont également présents en proportions comparables.

Il est donc à remarquer en conclusion combien toutes les modifications morphologiques pourtant nettes, imposées par la sélection et la culture (notamment les variations de taille et d'abondance des cônes, de précocité et de rendement productif des plants), touchent assez peu au caractère biochimique de la plante, à la nature et à la répartition de ses constituants, tout au moins en ce qui concerne les dérivés flavoniques (*). Le fait est peut-être moins surprenant qu'il n'y paraît a priori: "l'acclimatation" de cette espèce est relativement récente, quelques siècles tout au plus, et l'évolution entraînée par l'intervention humaine n'a pu

---

(*) Avec une éventuelle restriction concernant la fraction osidique des flavonols.

tellement faire diverger les sous-espèces par rapport à la souche originelle, surtout en ce qui concerne des composés à caractère "primitif", comme le sont les leucoanthocyannes selon BATE-SMITH (25).

La distribution flavonique est donc particulièrement spécifique, et ne caractérise pas le genre, puisque l'on trouve de la lutéoline dans Humulus japonicus. Il serait intéressant, semble-t-il, d'étudier à cet égard un hybride éventuel des deux espèces.

Un autre aspect du métabolisme flavonique a pu être envisagé en collaboration avec des chercheurs australiens: NASH et MULLANEY (189) ont étudié l'influence de l'acide gibérellique sur le développement du houblon et la teneur en résines des cônes mûrs: à la dose de 12,5 p.p.m., le poids moyen des cônes croît de 0,77 à 1,10 g. L'intérêt économique du procédé est malheureusement nul, car la teneur en résines subit en contre-coup une importante diminution, passant de 21,8 à 9,7 %, les résines α en particulier de 10,2 à 1,8 %.

Il nous a été possible d'examiner la composition flavonique des mêmes échantillons, soit cônes et feuilles:

la teneur des cônes témoins en leucodérivés totaux est de 2,12 %; elle s'abaisse à 1,51 % sous l'influence de l'acide gibérellique, soit une diminution significative de 29±7 % relatifs. De plus, si l'on tient compte des poids respectifs des cônes, l'on constate que la capacité de production ou d'accumulation en demeure rigoureusement inchangée; comme pour les résines, ce procédé de culture ne présente donc pas d'intérêt économique en ce qui concerne les tanins leucoanthocyaniques. La distribution relative des deux leucodérivés reste inchangée.

Le cas des feuilles est assez différent quant à la distribution absolue des leucoanthocyannes, mais il convient de noter dès maintenant que la période de maturité des cônes constitue une "morte-saison" de la biosynthèse des leucodérivés dans les feuilles (v.i. 4.2.1.): les résultats obtenus sont donc probablement peu significatifs du point de vue biochimique. Les feuilles des plants témoins contiennent en effet 0,5 % de leucoanthocyannes et cette teneur s'élève à 0,8 % chez les plants traités; la distribution relative est identique (40 parties de leucocyanidine pour 60 de leucodelphinidine), tout comme celle des deux flavonols (rapport kempférol/quercétine voisin de 2); la teneur en flavonols totaux demeure constante.

4.2. Dynamique des flavonoïdes.

Le cycle annuel du houblon s'étend d'avril à octobre: au développement initial des tiges et des feuilles succède en Juillet la floraison, puis la maturité des cônes est atteinte en Septembre.

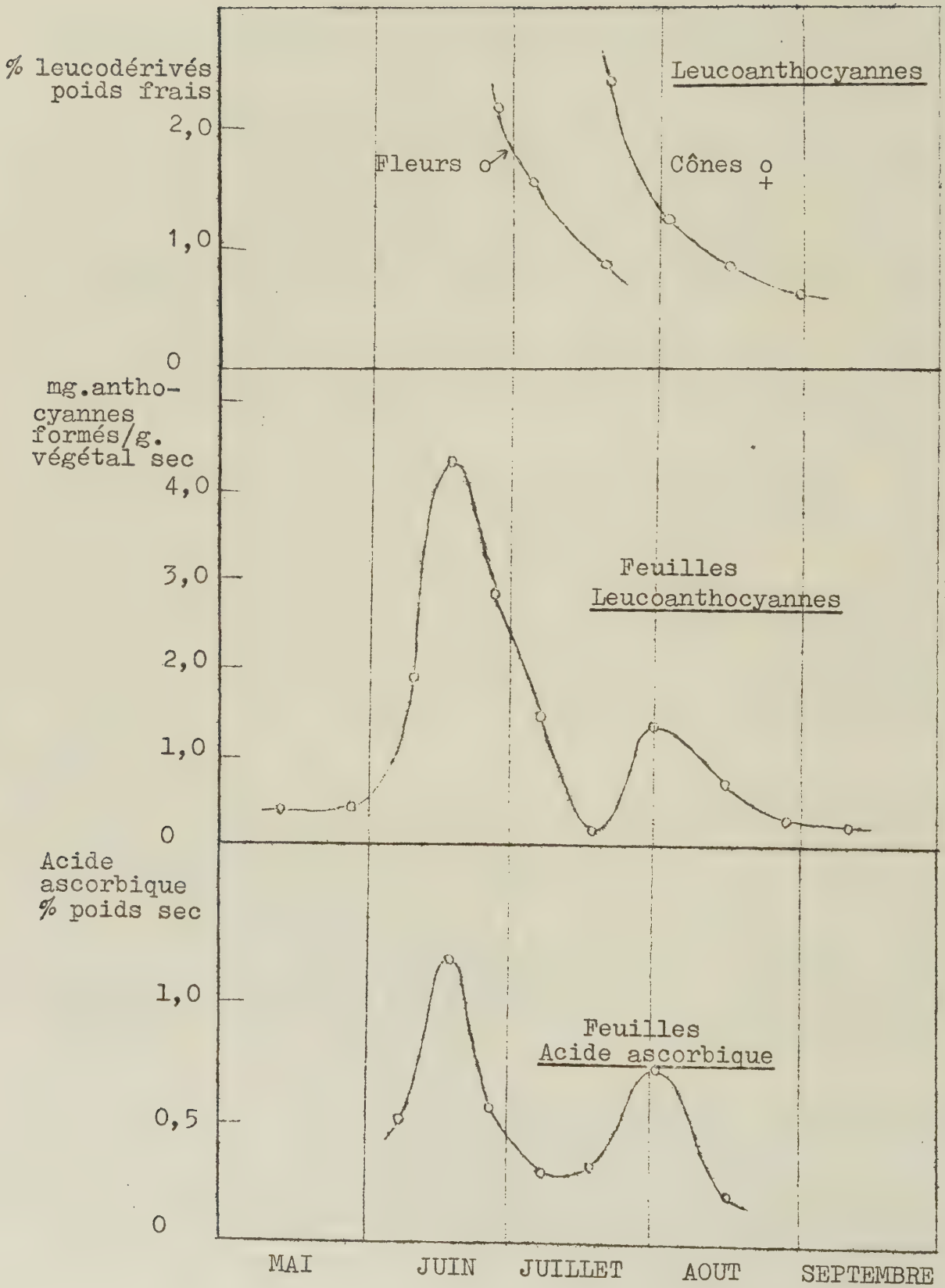


Fig. 5

Fig. 6

Fig.7

4.2.1. Evolution saisonnière des leucoanthocyannes.

Les cônes présentent une teneur initiale élevée en leucodérivés, diminuant progressivement au cours de leur croissance; il en est de même des inflorescences et fleurs ♂ (Fig.5). Il semble donc qu'une réserve en leucoanthocyannes soit constituée dans ces parties de la plante dès le début de leur développement.

Il en est bien autrement en ce qui concerne les feuilles (Fig.6), avec, en particulier, un important maximum de teneur, au tiers de leur taille adulte, vers le milieu du mois de Juin. Il est à souligner que les minima de Juillet et de Septembre coïncident avec la floraison et la maturation des cônes; les proportions relatives des deux formes subissent également d'assez nettes variations en cours de saison:

	Mi-Mai	Mi-Juin	Mi-Juillet	Mi-Septembre
Leucocyanidine	75 %	50	65	40
Leucodelphinidine	25	50	35	60

La concordance existant entre l'appauvrissement particulièrement marqué des feuilles en leucoanthocyannes et l'apparition des cônes, à teneur initiale maximale, nous pousse à considérer les feuilles du houblon comme un site essentiel de la biosynthèse des leucodérivés, dont les cônes ne constitueraient que des lieux d'accumulation et de réserve.

BATE-SMITH (189) interprète toutefois ces faits dans les termes suivants: "Il semble plus vraisemblable que les réserves nutritives de la plante (mais non les leucoanthocyannes) sont détournées pour le développement des fleurs, si bien que la synthèse s'arrête dans les feuilles. La chute apparente de la teneur en leucodérivés est probablement due à l'immobilisation de leucoanthocyannes complexes dans les parois cellulaires et non à une décroissance de la teneur totale, mais ceci est seulement une suggestion".

4.2.2. Evolution saisonnière des flavonols et de l'acide ascorbique.

La teneur des feuilles en flavonols est en net contraste avec l'évolution des leucoanthocyannes; la somme flavonols atteint en effet quelques pour mille, mais se caractérise surtout par sa constance en cours de saison (4,3 ± 0,6 ‰ en poids sec):

	Mi-Mai	Mi-Juin	Mi-Juillet	Mi-Septembre
Quercétine :	1,07 ‰	1,14	1,35	1,06
Kempférol :	3,81	2,48	2,94	3,53
Somme flavonols :	4,9	3,6	4,3	4,6
Rapport K/Q :	3,56	2,18	2,17	3,34

On constate toutefois que la teneur en kempférol subit un fléchissement en milieu de saison, accompagné d'un certain antagonisme avec la quercétine.

Des déterminations de la teneur saisonnière en acide ascorbique, dont on connaît l'influence importante sur les phénomènes de germination et de développement végétaux, ont également été conduites sur les feuilles, à l'aide de la méthode classique de dosage volumétrique par le dichlorophénol-indophénol. Les résultats (Fig.7) montrent une étroite ressemblance de la courbe traduisant cette évolution avec celle résumant les résultats précédemment obtenus pour les leucodérivés; ce fait est en faveur de l'existence d'une relation entre les métabolismes respectifs de ces deux composés.

La teneur des fleurs et cônes est par contre très faible, la limite supérieure de 30 mg./100 g. poids frais étant encore 5 fois moindre que la teneur moyenne dans les feuilles; à cela s'ajoute le fait que le cuivre et le manganèse, oligo-éléments essentiels pour les réactions d'oxydo-réduction cellulaire, sont de 2 à 3 fois plus abondants dans les feuilles que dans les cônes (*). Ces données tendent à confirmer nos précédentes conclusions et nous permettent d'insister sur le rôle important, sinon prépondérant, des feuilles dans la localisation des processus de la biosynthèse leucoanthocyanique.

4.3. Schémas biogénétiques.

Dans l'état actuel des techniques et en dehors de cas très particuliers, les schémas biogénétiques d'origine purement chimique doivent être considérés surtout comme des hypothèses de travail, que seul pourra vérifier l'emploi de substances marquées; notre problème n'échappe pas à cette règle, mais il nous a semblé que le nombre restreint de flavonoïdes mis en cause pouvait faciliter l'établissement de théories concernant notamment les interrelations leucoanthocyannes-flavonols.

Ainsi, l'acide ascorbique, réducteur actif, jouant un rôle dans la biogénèse des leucodérivés, nous est-il permis de

(*) Analyse semi-quantitative des cendres par spectrographie d'émission.

rejeter l'hypothèse d'une filiation des flavonols (plus "oxydés") à partir des leucoanthocyannes. La réaction inverse peut posséder a priori certains critères de vraisemblance :

Quercétine ⟶ (4 H) Leucocyanidine

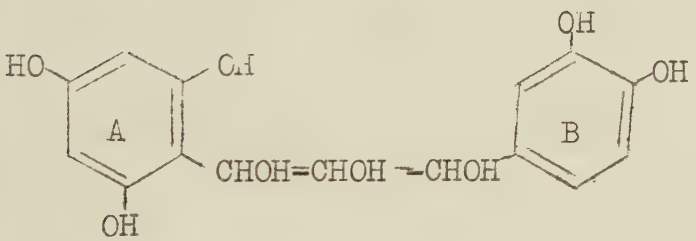
2 acide ascorbique ⟶ 2 Acide déhydroascorbique

Deux objections majeures à celà cependant :

- le leucodérivé (leucopélargonidine) correspondant au kempférol n'existe pas dans les fleurs de houblon, tout comme d'ailleurs, pratiquement, le flavonol (myricétine) homologue de la leucodelphinidine; flavonols et leucoanthocyannes se présentent de plus différemment, ceux-ci comme aglycones, ceux-là sous forme d'hétérosides;

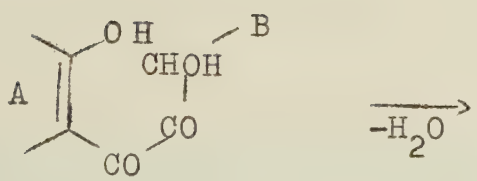
- cette réduction entraînerait sans doute la présence de flavanonols (absents du houblon) comme intermédiaires.

Une précédente publication (190) nous a permis de proposer à ce sujet une hypothèse biogénétique s'appuyant sur des données dues à SESHADRI (191): cet auteur, reprenant l'idée du précurseur postulé par ROBINSON (13), propose le schéma suivant pour la biosynthèse des flavonols:

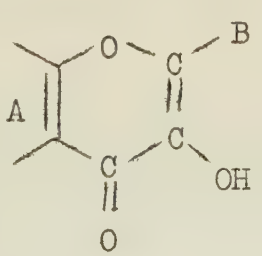


$\xrightarrow{-2H}$ A–C(=O)–C(=O)–CHOH–B

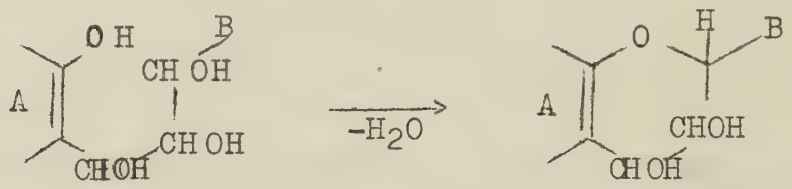
forme cyclisable en flavonol, par déshydratation selon :



$\xrightarrow{-H_2O}$

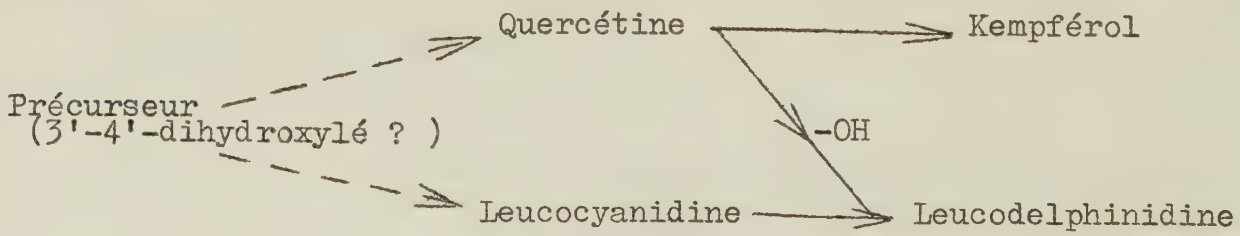


Mais il est à remarquer que les leucoanthocyannes ne sont autres que la forme cyclique du précurseur C_6-CHOH-CHOH-CHOH-C_6 , par simple réaction de déshydratation selon:



La cyclisation du précurseur conduisant à la structure leucoanthocyanique se fait sans modification rédox, tandis que la réaction de formation des flavonols nécessite une double oxydation. L'acide ascorbique pourrait inhiber la synthèse des flavonols (*) et être capable, en conséquence, de favoriser la formation compétitive des leucodérivés. Dans cette hypothèse, tout défaut d'acide ascorbique se traduit par un bloquage de la synthèse des leucoanthocyannes par détournement du précurseur: ainsi se justifierait le parallèlisme évolutif relevé entre leucodérivés et acide ascorbique, ce dernier jouant un rôle d'antioxydant plus que de réducteur à proprement parler. Il se pourrait toutefois que cette relation ne soit qu'apparente, et que l'évolution des deux composés ne fasse que traduire le caractère chimique général de la cellule à l'instant considéré.

La coexistence de plusieurs types d'hydroxylation du noyau phényle latéral est plus difficilement expliquable. Une première hypothèse (190), reprenant une conception de RAO et SESHADRI (192) pour la synthèse de la gossypétine (Hexahydroxy-3-5-7-8-3'-4'-flavone) et de l'herbacétine (Penta-hydroxy-3-5-7-8-4'-flavone) à partir de la quercétine dans Gossypium herbaceum par transferts de groupements hydroxyles phénoliques, nous avait conduit au schéma suivant:



(*) Le premier intermédiaire de l'oxydation conduisant du précurseur linéaire au flavonol, selon SESHADRI (191), est d'ailleurs un ène-diol, tout comme l'acide ascorbique.

Nous avions relevé en effet que la présence prépondérante de kempférol (feuilles) s'accompagne d'une forte proportion relative de leucodelphinidine; inversement, la quercétine et la leucocyanidine prédominent dans les fleurs et dans les cônes mûrs. Notons de plus que les termes ultimes de l'enchaînement proposé se trouvent donc bien préférentiellement dans les parties de la plante auxquelles nous avons attribué le rôle biosynthétique le plus important (feuilles). Enfin, un certain antagonisme quercétine - kempférol a été depuis relevé, qui pourrait s'accorder également avec le schéma précité.

Par contre, de nouveaux indices viendraient plutôt infirmer cette hypothèse:

-Une forte teneur en kempférol n'est pas toujours accompagnée d'une proportion très élevée de leucodelphinidine (feuilles, mi-Mai).

- Lesteneurs respectives en flavonols et leucodérivés - et leurs variations saisonnières - sont trop différentes pour qu'une interrelation aussi directe puisse, semble-t-il, être envisagée. Cette remarque implique par ailleurs l'existence d'un précurseur commun éloigné, au moins de l'une des deux structures, pour que les antagonismes métaboliques en résultant puissent être "amortis" par une chaîne suffisamment complexe. De même ces faits sont en contradiction avec l'hypothèse, déjà ci-dessus rejetée, d'une filiation directe flavonols ⟶ leucoanthocyannes.

Aucune conclusion définitive ne saurait pourtant être tirée des faits exposés précédemment, et notre travail ne constitue que l'approche indispensable d'une future étude à l'aide de ^{14}C* ; à cet effet, la période la plus favorable se présente en Juin, bien que la phase de développement des cônes mérite elle aussi de retenir l'attention.

5. ETUDE de QUELQUES METHYL-3-FLAVONOLS

Quelques méthyl-3 flavonols (méthoxy-3-flavones) de la série dihydroxy-5-7- ont été obtenus comme intermédiaires de la synthèse de flavonols (puis de leucoanthocyannes ultérieurement), soit :

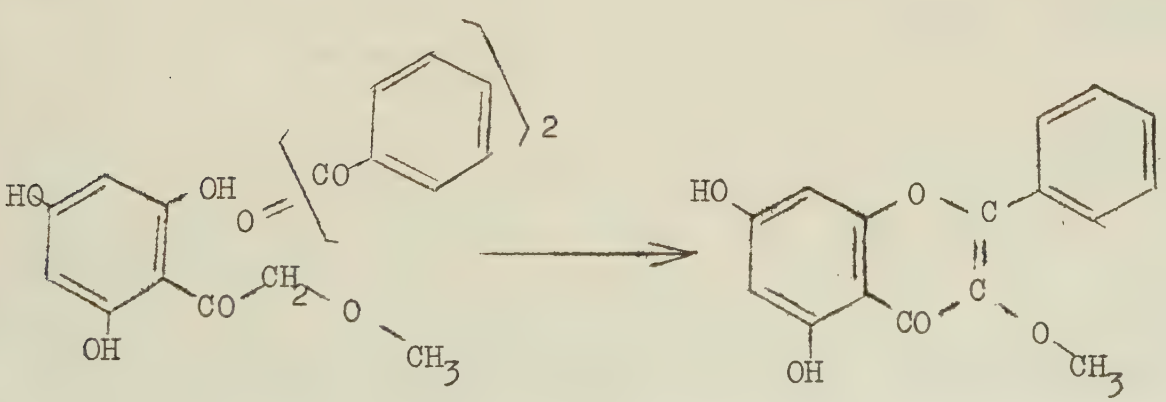
- méthyl-3-galangine (galangine = dihydroxy-5-7-flavonol);
- diméthyl-3-4'-kempférol;
- tétraméthyl-3-3'-4'-5'-myricétine.

La synthèse de ces trois composés a été réalisée depuis plusieurs dizaines d'années; cependant leurs caractères analytiques semblent avoir été insuffisamment décrits, en particulier leurs propriétés spectrophotométriques, vraisemblablement en raison du peu de développement des techniques correspondantes à l'époque de leur première obtention; il nous a paru utile de combler cette lacune.

Les méthyl-3-flavonols sont peu répandus in natura, et notamment dans la série dihydroxy-5-7- seule la méthyl-3 galangine a été signalée dans Alpinia officinarum (193).

5.1. Synthèse de méthyl-3 flavonols selon ROBINSON (194).

On utilise dans ce but la condensation par chauffage de l'ω-méthoxy-phloracétophénone avec un mélange d'anhydride aromatique et du sel de sodium de l'acide correspondant, selon :



les réactifs étant dans les proportions molaires moyennes: ω-méthoxy-phloracétophénone : 1, anhydride d'acide : 2,5, sel de sodium : 2 . On porte le mélange réactionnel sec à 180°C pendant 3 heures.

L'ω-méthoxy-phloracétophénone est préparée selon SLATER et STEPHEN (195) par condensation du méthoxy-acétonitrile avec la phloroglucine (formation d'un chlorhydrate de cétimine intermédiaire, par action de HCl gazeux sur la solution éthérée des deux composés, avec décomposition ultérieure par l'eau bouillante); PF: 195°C; rendement 73 %.

Le méthoxyacétonitrile est lui-même synthétisé par réaction du cyanure de sodium, du formaldéhyde et du sulfate de méthyle, avec isolement par distillation sous pression réduite (196): PE: 118-120°C/ press. atm.; rendement 67 %.

L'anhydride anisique est préparé par action prolongée d'un excès d'anhydride acétique sur de l'acide anisique (194) ; PF : 97°C; rendement : env. 40 %.

L'acide triméthylgallique est obtenu par action du sulfate de méthyle sur l'acide gallique en milieu alcalin (197), sous atmosphère d'azote; PF : 167°C; rendement 50 %. L'anhydride correspondant est synthétisé selon HEAP et ROBINSON (198) par action du chlorure de thionyle sur une solution éthéro-pyridinique de l'acide, avec hydrolyse ultérieure à froid; PF : 155°C; rendement: 52 % (Tous les constantes physiques et rendements sont donnés après recristallisations ou distillation).

Les sels de sodium ont été obtenus par exacte neutralisation des acides correspondants.

Le mélange réactionnel obtenu après condensation à chaud est trop impur pour livrer sans plus le méthyl-3 flavonol. On saponifie l'excès d'anhydride et précipite sélectivement le flavonoïde par barbottage de CO_2 ; pour sa purification le dérivé 5-7-diacétylé est préparé par action de l'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium. On recristallise à deux reprises dans l'éthanol pur en présence de noir animal, puis on désacétyle par ébullition en milieu chlorhydrique (HCl 1,5 N dans l'éthanol 80° pendant 3 h.) . Le méthyl-3-flavonol ainsi obtenu est recristallisé à deux reprises dans l'acide acétique 60 % en présence de noir animal. Malgré le nombre relativement élevé d'opérations distinctes, le rendement par rapport à l'ω-méthoxy-phloracétophénone est très convenable et plusieurs g. de chaque flavonoïde ont été ainsi obtenus. La déméthylation par le chlorhydrate de pyridine conduirait ultérieurement au flavonol avec des rendements presque quantitatifs.

A titre d'exemple, 4,5 g. d'ω-méthoxy-phloacétophénone + 23 g. d'anhydride triméthylgallique + 10 g. de triméthylgallate de sodium ont fourni 7,0 g. de flavonoïde impur, de PF 260-5°C (Théorie : 8,5 g.,PF: 277°C). L'acétylation livre 6,76 g. de dérivé recristallisé dont l'hydrolyse chlorhydrique fournit 5,44 g. de tétraméthyl -myricétine, PF : 282°C, rendement global : 64 %.

Les principales caractéristiques cryométriques suivantes ont été relevées; le PF du diacétate du diméthyl-kempférol n'avait pas été signalé:

	Flavonol méthylé	Dérivé diacétylé
Méthyl-Galangine	295°C	177°C
Diméthyl-Kempférol	235°C	164°C
Tétraméthyl-Myricétine	282°C	

5.2. Propriétés générales. Etude analytique comparée avec les flavones homologues.

5.2.1. Etude spectrophotométrique U.V.

Dès 1928, HATTORI (199) remarquait que les spectres U.V. de la flavone (non substituée) et du méthyl-3-flavonol sont sensiblement identiques; cette conclusion a été confirmée dans ce cas particulier par SKARZINSKY (200), qui a étudié l'influence de la méthylation des groupements hydroxyles en 5,6,7,2' et 3' (spectre non modifié par rapport au groupement libre), en 4' (petite influence hypsochrome sur la bande I (*), et en 3 (profond changement, déplacement hypsochrome de la bande I du flavonol; le spectre se distingue alors à peine de celui de la flavone, notamment par l'écartement des bandes I et II) .

Il nous a donc paru tout particulièrement intéressant de chercher à généraliser ou infirmer ces conclusions en nous livrant à une étude comparée de nos trois méthyl-3-flavonols, et de leurs flavones homologues antérieurement obtenues dans notre Laboratoire, soit :

- Chrysine, dihydroxy-5-7-flavone, synthétisée par TEOULE (201);
- Acacétine, dihydroxy-5-7-méthoxy-4'-flavone, synthétisée par MENTZER et PILLON (202);
- Méthyl-tricine, dihydroxy-5-7-triméthoxy-3'-4'-5'-flavone, synthétisée également par MENTZER et PILLON (203).

Nous avons cherché d'autre part à étendre le domaine des mesures en envisageant l'action de réactifs ionisants (soude N/100 réagissant sur les fonctions -OH en 5 et -OH en 7) et chélatants (ions Al^{3+} réagissant sur les fonctions = CO en 4 et -OH en 5) sur ces flavonoïdes.

(*) Bande I: la plus proche du visible; les bandes sont numérotées du visible vers l'U.V. (voir PILLON (204)).

Les tableaux ci-dessous résument les résultats quantitatifs obtenus; au cas des flavonoïdes a été joint le couple phloracétophénone -ω-méthoxy-phloracétophénone que l'on peut considérer comme un premier terme de la série considérée.

ETHANOL 96°	Max. II		Max. I		min. II		min. I	
	λ mμ.	log ε	λ mμ.	log ε	λ mμ.	log ε	λ mμ.	log ε
Chrysine	269	4,52	314	4,13	233	3,97	300	4,08
Méthyl-Galangine	267	4,46	312	4,06	234	4,07	305	4,06
Acacétine	269	4,28	329	4,29	245	3,94	282	4,13
Diméthyl-Kempférol	268	4,37	349	4,29	245	4,10	281	4,09
Méthyl-Tricine	271	4,17	332	4,23	254	4,02	283	3,97
Tétraméthyl-Myricétine	268	4,24	346	4,20	241	4,10	283	3,99

	M_{III}		M_{II}		m_{II}	
Phloracétophénone	227	4,13	287	4,28	245	2,74
ω-méthoxy-phloracétophénone	226	4,13	288	4,28	245	2,72

SOUDE N/100 éthanol 10° in	M_{III}		M_{II} (*)		M_I		m_{II}		m_I	
Chrysine	–		274	4,55	360	4,13	244	4,25	310	3,80
Me-Galangine	219	4,39	274	4,47	363	4,03	245	4,16	311	3,72
Acacétine	218	4,42	274	4,43	365	4,17	247	3,97	324	3,95
DiMe-Kempférol	220	4,48	274	4,49	370	4,19	246	4,07	326	4,01
Me-Tricine	–		276	4,37	366	4,07	250	3,97	329	3,95
TétraMe-Myricétine	–		275	4,42	371	4,09	250	4,06	330	3,98

	M_{III}		M_{II}		m_{II}	
Phloracétophénone	227	4,17	317	4,24	267	3,13
ω-méthoxy-phloracétophénone	226	4,14	316	4,40	267	3,12

(*) Avec, dans le cas des quatre derniers flavonoïdes, un maximum secondaire ou un épaulement vers 295 mμ.

Al^{3+} 1,86 M/100 in éthanol 96°
(4,5 g./l. $AlCl_3, 6\ H_2O$)

	M II		M I		M' I		m II		m I		m' I	
(*)												
Chrysine	282	4,51	326	4,14	384	3,87	238	3,95	307	3,91	358	3,78
Me-Galangine.	280	4,42	330	4,09	397	3,87	240	4,01	309	3,86	362	3,68
(**)												
Acacétine ...	280	4,29	336	4,32	381	4,09	249	3,86	312	4,00	366	4,06
DiMe-Kempférol	278	4,34	342	4,29	397	4,13	250	4,02	315	3,96	371	4,02
(***)												
Me-Tricine...	282	4,22	340	4,22	382	3,99	258	3,93	316	4,04	375	3,99
TétraMe-Myricétine...	280	4,27	343	4,19	399	4,03	245	3,98	318	4,01	377	3,97
ω-méthoxy-phloracéto-phénone..	304	4,34	369	3,35			251	2,76	341	3,29		

(*) Avec un maximum et un minimum secondaires à 251 et 257mμ.

(**) Avec un dédoublement de la bande II, avec une seconde composante à 300 mμ., minimum vers 290 mμ.

(***) Avec épaulement vers 295-300 mμ.

A titre d'exemple, les fig. 8, 9 et 10 illustrent les chiffres ci-dessus dans le cas de la méthyl-tricine et de la tétraméthyl-myricétine.

On remarque la grande similitude des spectres, comparés deux à deux, surtout en présence de soude ou de chlorure d'aluminium; dans l'éthanol toutefois, l'importance relative de la bande I par rapport à la bande II est plus grande chez les flavones, tandis que cette même bande I (couple chrysine-méthyl-galangine excepté) est plus proche du visible chez les méthoxy-3-flavones (effet bathochrome des substitutions en 3, comme pour un groupement -OH notamment). La bande II possède par contre des caractéristiques de position et d'absorption communes aux six flavonoïdes examinés, et ceci dans les trois milieux envisagés.

Pour certains des composés examinés en milieu sodique apparaît une troisième bande près de 220 mμ.; comme l'influence des ions alcalins se traduit par un déplacement bathochrome des bandes II et I, nous sommes tenté d'attribuer cette apparition à la bande III observée en solution éthanolique par PILLON (204)chez certaines flavones fortement hydroxylées, mais demeurant inaperçue chez les autres flavonoïdes.

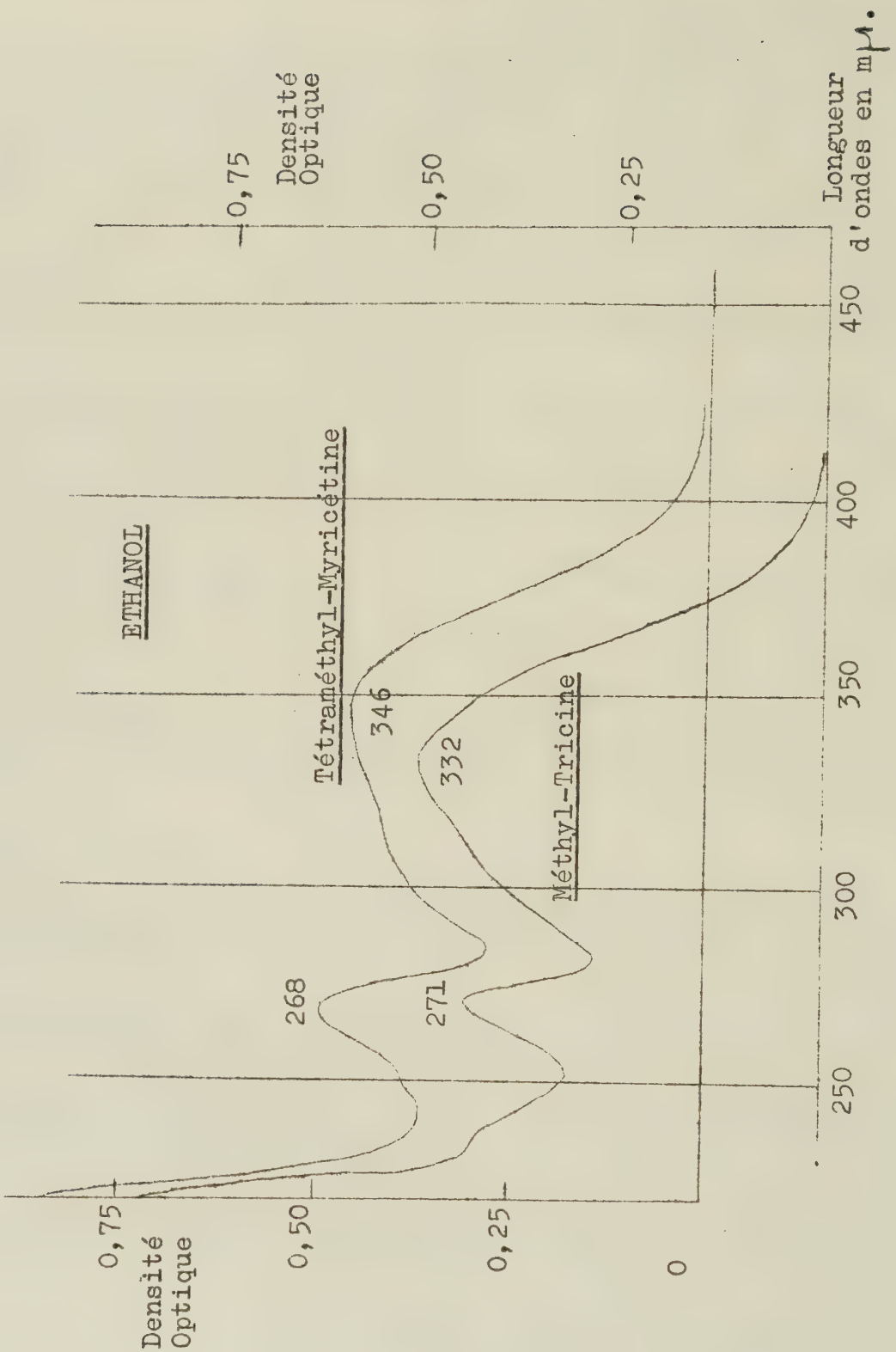

ETHANOL
Tétraméthyl-Myricétine
Méthyl-Tricine
346
332
268
271
0,75
0,50
0,25
0
Densité Optique
250
300
350
400
450
Longueur d'ondes en mμ.

Fig. 8

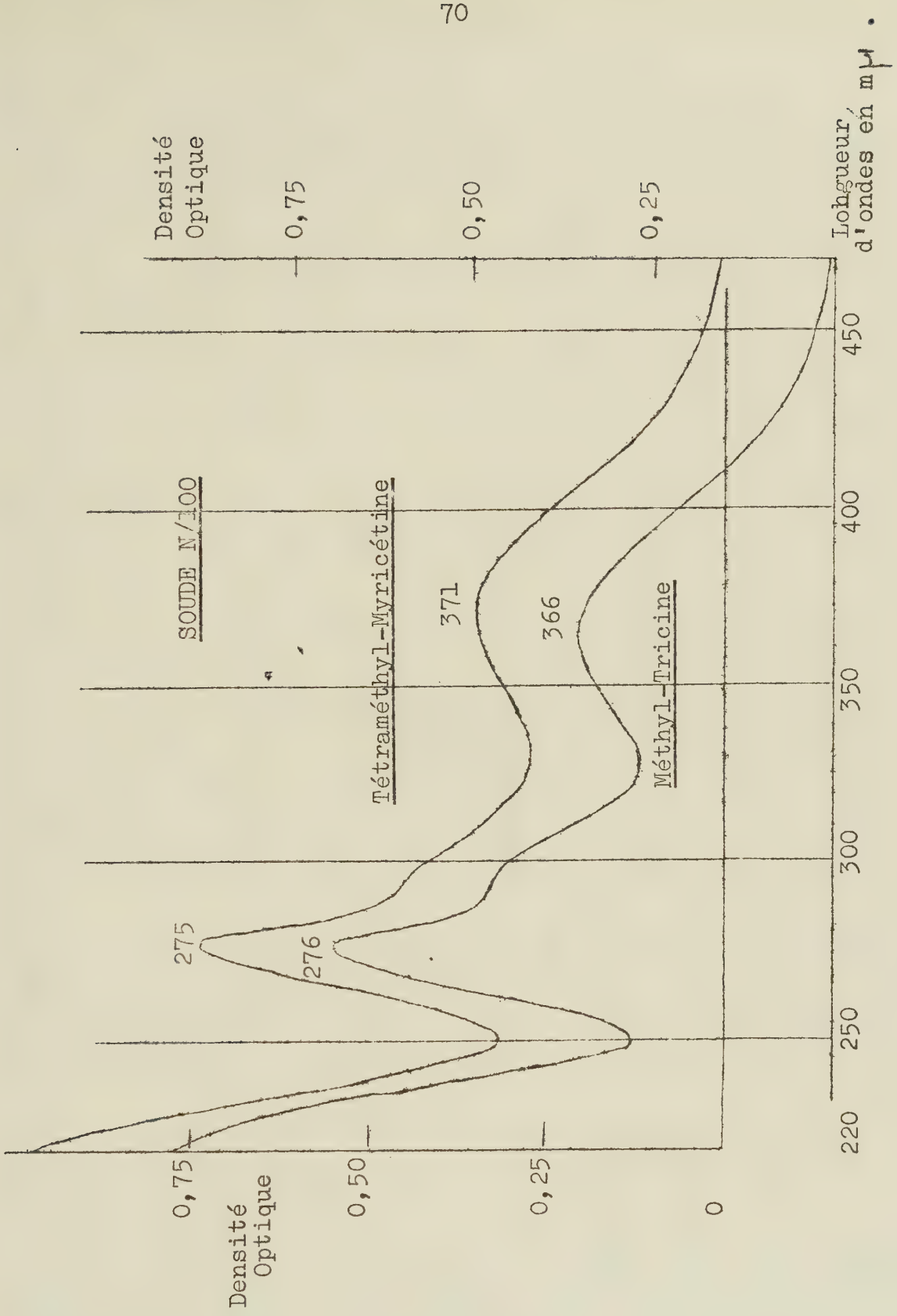

Densité Optique
0,75
0,50
0,25
Longueur d'ondes en mμ.
220
250
300
350
400
450
SOUDE N/100
Tétraméthyl-Myricétine
371
366
Méthyl-Tricine
275
276
0,75
0,50
0,25
0
Densité Optique

Fig. 9

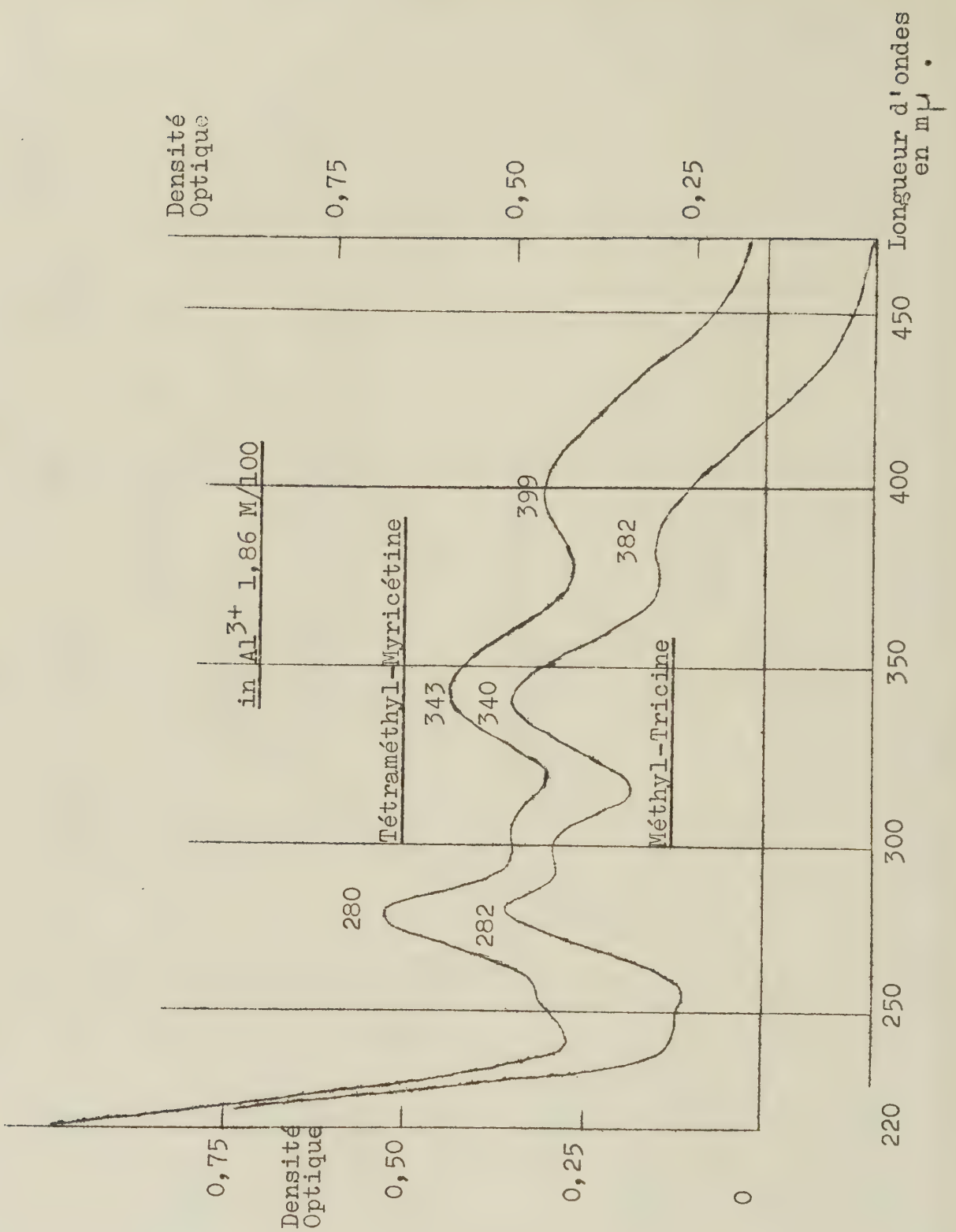

Densité Optique
0,75
0,50
0,25
0
Densité Optique
0,75
0,50
0,25
in Al^{3+} 1,86 M/100
Tétraméthyl-Myricétine
Méthyl-Tricine
280
282
343
340
399
382
220
250
300
350
400
450
Longueur d'ondes en mμ.

Fig. 10

L'influence de la chélation se traduit par un dédoublement de la bande I; quant à la bande II, qui subit un important déplacement bathochrome, l'apparition d'une deuxième composante, généralement secondaire, mais située à de plus courtes ou de plus grandes longueurs d'ondes, est à signaler.

Nous soulignerons enfin cette similitude générale des propriétés spectrales des flavones et méthyl-3-flavonols en opposant ces derniers aux flavonols correspondants:

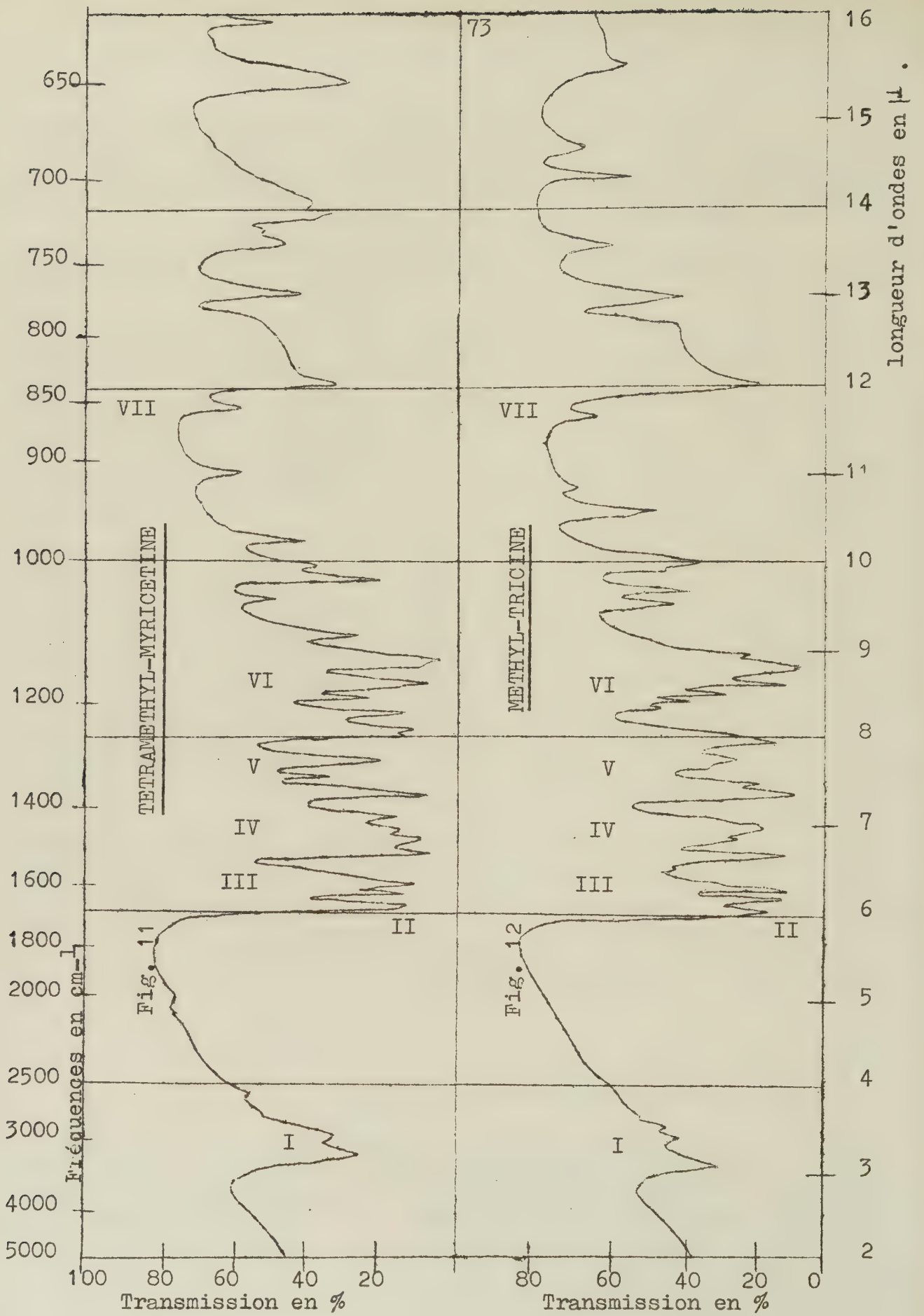
la stabilité des spectres obtenus en milieu sodique et chélatant est parfaite chez les flavones et méthyl-3-flavones, alors que les flavonols sont rapidement dégradés en milieu alcalin (et même dans une certaine mesure en présence d'ions Al^{3+}), avec évolution des spectres (v.s. 3.2.2. notamment); notons qu'il en est de même des glycosides en 3 des flavonols (rutine en particulier), ce qui confirme les données de l'hydrolyse acide et les caractéristiques spectrophotométriques (position et écartement des bandes), sur la différence de nature existant entre une liaison hétérosidique et une liaison éther-oxyde.

Une exception apparente à la loi générale ainsi énoncée concerne le cas de la quercétine et de la méthyl-3-quercétine, étudiées par KUHN et LÖW(205) : les spectres éthanoliques sont assez voisins, avec maxima vers 255 et 360 mμ . Cependant, outre une certaine imprécision des spectres présentés, due très probablement à des raisons technologiques (mesures datant de 1944), cette similitude est plutôt attribuable à une ressemblance fortuite par troisième terme interposé: il se trouve en effet que la lutéoline, flavone correspondante, absorbe elle-aussi dans les mêmes domaines; d'ailleurs, d'après KUHN également, les spectres de la quercétine et de la méthyl-3-quercétine en milieu alcalin sont très différents.

En conclusion, toutes ces données confirment et généralisent les remarques de HATTORI et de SKARZINSKY; de même pouvons-nous noter que les observations de PILLON relatives à l'identité des spectres (bande I) des flavones 4'- et 3'-4'-5'-méthoxylées, et à l'effet bathochrome de la substitution en 4' d'un flavonoïde sans autre groupement sur le noyau B, sont également valables dans le cas des méthoxy-3-flavones.

5.2.2. Etude spectrographique I.R.

L'application des techniques de mesure dans l'infrarouge au domaine des flavonoïdes a fait l'objet d'un nombre assez limité de travaux, ce qui justifie déjà cette étude dans un but purement systématique et analytique : des huit spectres


73
TETRAMETHYL-MYRICETINE
METHYL-TRICINE
VII
VI
V
IV
III
II
I
Fig. 11
Fig. 12
Fréquences en cm-1
650
700
750
800
850
900
1000
1200
1400
1600
1800
2000
2500
3000
4000
5000
Longueur d'ondes en μ.
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
100
80
60
40
20
0
Transmission en %
Transmission en %

étudiés(*), seul celui de la chrysine avait été décrit.

L'examen des fréquences des bandes d'absorption dues aux groupements -OH ou =CO a fourni des preuves structurales déjà mentionnées, pour les catéchines (114) ou les flavanonols (46); nous avons cité également diverses déterminations effectuées dans le cas des leucoanthocyannes; on trouve enfin, ça et là dans la littérature, mention de cette technique pour l'identification de flavonoïdes naturels par comparaison avec des produits de référence.

Comme études structurales systématiques, nous ne pouvons par contre citer que cinq travaux :

- Dans un cadre d'étude assez général, HERGERT et KURTH (207) ont relevé les fréquences -OH et =CO de la quercétine et de certains de ses dérivés méthylés, de flavanones et d'acétophénones.(Technique : examen à l'état solide).

- SHAW et SIMPSON (208) ont discuté principalement de l'influence de l'hydroxylation en 3 et de la méthoxylation en 7 sur la fréquence =CO de 24 flavones et flavanones. (Technique: solution dans CCl_4).

- HENRY et MOLHO (209) ont examiné plus de 20 chromones, flavones et flavanones, avec l'aide de la méthylation et de la deutération pour l'étude des fréquences -OH. (Technique : état solide ou dissous).

- INGLETT (210) enfin, a déterminé la position des bandes -OH et =CO d'une vingtaine de flavonoïdes et de certains de leurs glycosides. (Technique : état solide).

- Dans la série voisine des anthocyannes, RIBEREAU-GAYON et JOSIEN (211) viennent de donner les spectres complets des six dérivés les plus courants, avec essai d'attribution des bandes dans plusieurs régions du spectre. (Technique: état solide).

Il convient de souligner dès maintenant les limites de notre étude, qui porte sur un nombre réduit de composés et dans

---

(*) Ces spectres ont été déterminés dans le Laboratoire de Microanalyse CNRS, Service du Professeur COLONGE, par Monsieur SEMET que nous sommes heureux de pouvoir remercier ici. Le spectrographe utilisé est un appareil Perkin-Elmer, modèle 21 à double faisceau; les flavonoïdes ont été dispersés dans KBr, pour examen en phase solide, à la concentration de 0,2 %.
Les données générales concernant l'attribution des bandes d'absorption ont été puisées dans l'ouvrage de BELLAMY(206) : "The Infra-Red Spectra of complex Molecules".

des conditions d'examen plutôt défavorables à des études structurales: la technique de pastillage dans le KBr, si elle présente de nets avantages pratiques, laisse place en effet à des possibilités d'interactions moléculaires en phase solide, dont les effets peuvent venir se superposer aux phénomènes intramoléculaires et gêner ainsi l'attribution des bandes et l'interprétation des résultats.

Il n'en demeure pas moins que le fait de travailler pour comparaisons directes, dans une série homogène, où les substitutions sont limitées et progressives, devrait permettre de dégager quelques hypothèses, servant ainsi de base à des études spectrographiques plus approfondies.

Des spectres obtenus pour les trois flavones, leurs trois méthoxy-3-flavones correspondantes, et les deux acétophénones homologues, nous donnerons les principales fréquences et discuterons de l'attribution des bandes les mieux définies. Les spectres de la méthyl-tricine et de la tétraméthyl-myricétine sont reproduits à titre d'exemple (Fig. 11 et 12).

Le problème des fréquences -OH et =CO sera traité sous le même paragraphe, en raison des interactions, réelles ou supposées, de ces deux groupements :

REGION I : 4000-2000 cm^{-1} (-OH; -CH= aromatiques et $-CH_3$ interfèrent, ces derniers vers 2950 cm^{-1} en particulier (BELLAMY p.16,65)).

Chrysine	: 3070, 2910, 2680, 2620 (m.). (*)
Me-Galangine	: 3130-3100 (F.), 2920 (m.), 2590, 2520 (f.).
Acacétine	: 3125 (F.), 2570 (f.).
DiMe-Kempférol	: 3075 (F.), 2960, 2560 (m.).
Me-Tricine	: 3240 (F.), 2940, 2835 (m.).
TétraMe-Myricétine	: 3140 (F.), 2935, 2575 (m.).

Phloracétophénone	: 3505, 3440 (m.), 3090 (F.).
ω-Met-Phloracétophénone	: 3280 (F.), 2910 (f.).

(*) Précision des mesures :

-env.± 10 cm^{-1} dans la région I (3 μ .)
-env.± 2 cm^{-1} dans les régions II à IV (6-7 μ.)
-env.± 1 cm^{-1} dans les régions V à VII (au delà de 7 μ.).

REGION II : 2000-1630 cm^{-1} (=CO)

Chrysine	:	1652
Me-Galangine	:	1646
Acacétine	:	1675-51
DiMe-Kempférol	:	1651
Me-Tricine	:	1664
TétraMe-Myricétine	:	1654
Phloracétophénone	:	1630
o-Met-Phloracétophénone	:	1632 (*)

Chez les six flavonoïdes, les bandes =CO présentent un épaulement plus ou moins accentué à + 10 cm^{-1} environ, allant jusqu'au dédoublement pour l'acacétine, phénomène déjà signalé pour d'autres hydroxy-5-flavones (209).

On sait que la fréquence carbonyle libre (cétone aliphatique saturée par exemple) se situe vers 1715 cm^{-1}, et se déplace vers de plus basses valeurs pour toute participation de la fonction =CO à une liaison hydrogène, un équilibre céto-énolique...(BELLAMY p. 132...). Ainsi, dans une flavanone, la conjugaison de la double liaison cétonique avec le noyau A abaisse-t-elle la fréquence =CO vers 1685 cm^{-1}, et cet effet s'accentue encore lorsque, dans une flavone (ou dans la benzalacétophénone, où $\nu_{=CO}$ = 1667 cm^{-1}), la conjugaison avec le phényle latéral devient à son tour possible par l'intermédiaire de la double liaison en 2=3 : les flavones absorbent en effet généralement vers 1650 cm^{-1}, et il en est ainsi également de nos six composés.

Cependant, leur comparaison deux à deux montre que le passage de la flavone à la méthoxy-3-flavone correspondante s'accompagne d'un léger abaissement de fréquence d'une dizaine de cm^{-1}(**). Une tendance analogue se dégage de quelques données de

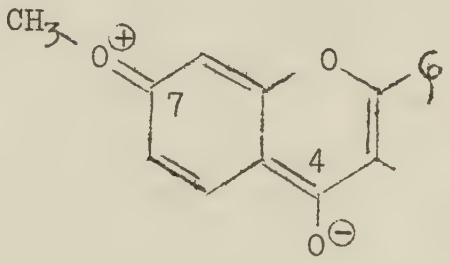
(*) HERGERT et KURTH (207) donnent:

- Acétophénone	:	1687 cm^{-1}
- Hydroxy-2-acétophénone	:	1635 -
- Hydroxy-4-acétophénone	:	1638 -
- Dihydroxy-2-4-acétophénone (résacétophénone)	:	1620 -

(**) Le fait est moins apparent pour le couple acacétine - diméthyl-kempférol, par suite du dédoublement de la bande =CO de la flavone.

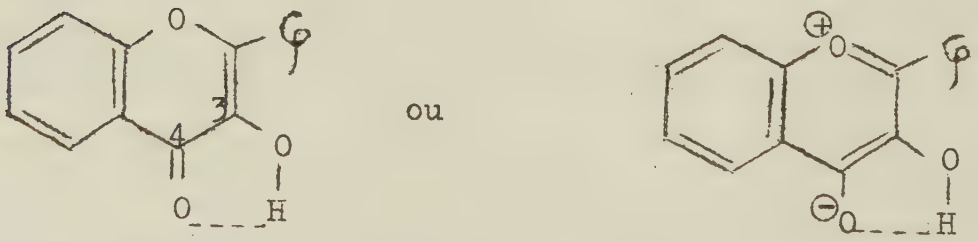
GRIPENBERG (212) sur des α-hydroxy- et α-méthoxy-chalcones.

Il est intéressant de comparer ce résultat aux données de SHAW et SIMPSON (208) d'après lesquels un abaissement du même ordre de grandeur de la fréquence =CO se manifeste par méthoxylation en 7, attribué à l'existence de la forme mésomère conjuguée :

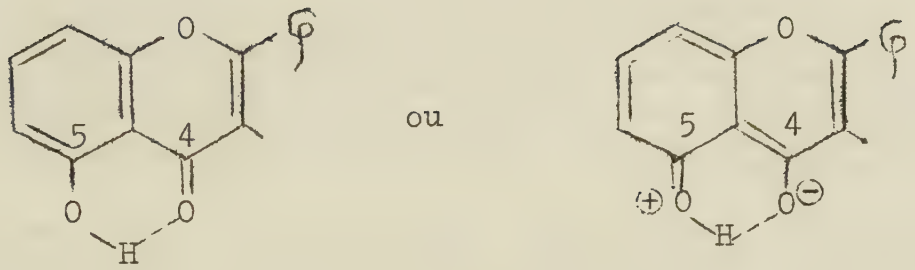


Un tel mécanisme ne semble cependant pas pouvoir s'appliquer à un méthoxyle en 3, dont l'influence demeure donc actuellement dépourvue d'interprétation satisfaisante.

SHAW et SIMPSON ont également étudié l'influence de la substitution en 3, mais en ce qui concerne le groupement hydroxyle, c'est-à-dire la différence de comportement existant entre flavone et flavonol homologues. Le très net abaissement (30 cm^{-1}) de la fréquence carbonyle qui se manifeste alors est attribué à une liaison hydrogène selon :



Mais le problème le plus discuté est sans doute l'éventuel pontage du groupement carbonyle avec l'hydroxyle des hydroxy-5-flavones; l'interaction de ces deux substituants ne fait aucun doute si l'on s'appuie sur des données purement chimiques (208,209) ou chromatographiques (v.s. 3.2.1.), et peut s'envisager par des liaisons hydrogènes selon :



Le phénomène est d'ailleurs parfaitement décelable en I.R. pour les flavanones et les acétophénones, où l'hydroxylation en 5 (c'est-à-dire en 2 chez les acétophénones) se traduit par un abaissement supplémentaire de la fréquence =CO de 40 cm^{-1} environ. Par contre dans la série des flavones, un tel effet ne se manifeste apparemment pas; le fait est largement signalé, mais aucune explication n'en est actuellement proposée.

Notons toutefois qu'aucune bande -OH n'est visible dans le spectre de l'hydroxy-5-tétraméthoxy-3-7-3'-4'-flavone (207) et d'autres hydroxy-5-flavones (208), ce qui indique donc bien que ce groupement doit être masqué par une quelconque participation intramoléculaire. HENRY et MOLHO (209) ont signalé de plus que les hydroxyles du noyau A absorbent à des fréquences inférieures à celles des hydroxyles du phényl latéral; ceci traduit probablement une plus grande aptitude à des associations, facilitées par leur proximité des points "actifs" de la molécule flavonique, et du =CO en 4 en particulier.

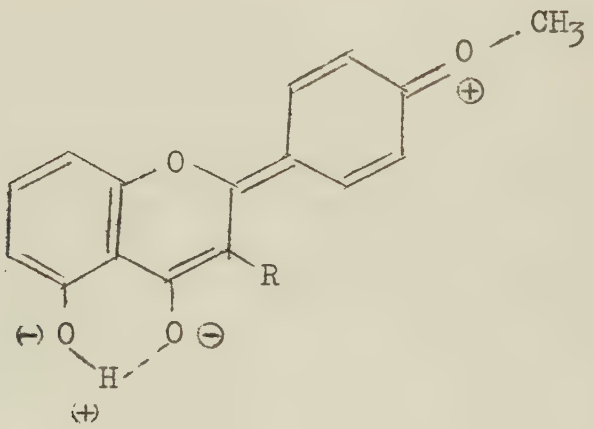
Ce serait d'ailleurs, pensons-nous, un point de vue trop simpliste que de considérer les déplacements de la fréquence carbonyle sous le seul angle de l'additivité des chromophores. De tels problèmes, comme toute étude I.R. en général, doivent être envisagées comme des fonctions à variables dépendantes, dont l'étude par comparaison de termes voisins d'une même série chimique, si elle constitue bien la meilleure approche expérimentale, ne saurait fournir au mieux qu'une résolution par approximations successives. Il ne convient donc pas de s'étonner outre mesure de ce que les fréquences =CO de flavonols et d'hydroxy-5-flavonols, par exemple, ne soient que peu différentes, les diverses possibilités par lesquelles se trouve sollicité le groupement carbonyle pouvant entraîner des effets compétitifs, voire antagonistes, dont seul le résultat global nous est perceptible.

L'examen des bandes -OH de nos composés nous a suggéré que l'interaction du carbonyle en 4 et de l'hydroxyle en 5 pouvait être un fait réel dans notre cas particulier :

- L'abaissement général de la fréquence -OH (-OH libre donne en effet une bande vers 3620 cm^{-1}) traduit déjà une forte association intramoléculaire (*).

- D'après les couples de spectres acacétine - diMe-Kempférol, Me-Tricine - TétraMe-Myricétine (**), le passage de la flavone à la méthoxyflavone correspondante s'accompagne d'un abaissement de la fréquence -OH, tout comme précédemment noté pour la fréquence =CO, ce qui peut appuyer l'hypothèse d'une interdépendance des deux groupements.

- De même, la plus basse fréquence -OH observée est celle du diméthyl-kempférol où le méthoxyle en 4' peut créer un effet renforçateur, dû à une structure mésomère du type proposé par HERGERT (207) et MOLHO (209) :



(*) Ou intermoléculaire, en raison de la technique de mesure; ceci donne toutefois une contribution vers 3500 cm^{-1}, tandis que des fréquences aussi basses que 3100 (2500) cm^{-1} correspondent bien à des liaisons intramoléculaires (BELLAMY p.96....) ; catéchines et leucoanthocyannes, où nulle liaison intramoléculaire n'est possible, absorbent d'ailleurs vers 3300-3350 cm^{-1} dans les mêmes conditions expérimentales.

(**) L'absorption due aux -OH chez la chrysine se traduit par l'existence d'un massif complexe autour de 3,5 μ ., nettement différent des bandes bien définies des autres flavonoïdes examinés (le phénomène se répète autour de 3 μ . pour l'acétophénone), et empêchant la comparaison de ce terme avec la méthyl-galangine. Ce résultat recoupe les données de MOLHO (209) qui a discuté de l'attribution des bandes de la chrysine dans cette région du spectre.

Par contre, une telle influence peut être gênée par la présence de substituants de même polarité en ortho- de ce groupement, donc "anticonjugués" : nous pensons pouvoir expliquer ainsi l'association plus lâche que traduisent les fréquences -OH relativement élevées de la méthyl-tricine et de la tétraméthyl-myricétine. De plus, c'est bien chez ces deux flavonoïdes que se manifestent les fréquences =CO les plus élevées, indice supplémentaire de l'interaction des deux groupements.

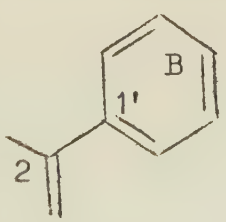
RÉGION III : 1630-1490 cm^{-1} (doubles liaisons aromatiques).

Chrysine	1615	1580-56	1499
Me-Galangine	1608	1584-70	1496
Acacétine	1629-08	1581-64	1512-05
DiMe-Kempférol	1610	1571	1499
Me-Tricine	1627	1598	1506
TétraMe-Myricétine	1613	1588	1499
	"1615"	"1585"	"1500"
Phloracétophénone	-	-	1531
ω-Met-Phloracétophénone	1603	-	1526

Cette région du spectre correspond à la présence des doubles liaisons conjuguées, celles des noyaux aromatiques notamment; il existe au voisinage de 1600 et 1500 cm^{-1} deux bandes à déplacement corrélatifs, la première d'entre elles absorbant plus près de 1625 cm^{-1} lorsque le noyau benzènique est conjugué avec une double liaison extranucléaire (BELLAMY p. 69, 72, 34).

Il en est bien ainsi de nos deux bandes "1615" et "1500", séparées par un intervalle de fréquence constant de 114 ± 3 cm^{-1} .

C'est également la conjugaison des noyaux phényles, notamment selon :



qui est à l'origine de la bande "1585" (BELLAMY p.71), d'ailleurs absente des spectres des catéchines, leucoanthocyannes et phloracétophénones, où une telle conjugaison est impossible.

REGION IV : 1490-1400 cm^{-1}		
Chrysine	1468	1450
Me-Galangine	1468	1445
Acacétine	1469	1431
DiMe-Kempférol	1472	1445
Me-Tricine	1462	1445
TétraMe-Myricétine	1465	1443
	"1468"	"1445"
Phloracétophénone	1468	-
ω-Met-Phloracétophénone	1464	-

La bande "1445" est très vraisemblablement d'origine aromatique également (BELLAMY p.72).

La région 1460 cm^{-1} est mentionnée comme pouvant correspondre aux groupements méthoxyles (BELLAMY p.25), RIBEREAU-GAYON et JOSIEN (211) ont effectivement noté une bande à 1462 ± 2 cm^{-1} chez les anthocyannes méthylés. Il ne semble pas qu'il puisse en être de même de notre bande "1468"; on l'observe en effet même chez la chrysine et la phloracétophénone, et son intensité n'est pas liée au degré de méthoxylation.

REGION V : 1400-1170 cm^{-1} (Fonctions phénol, éther-oxyde).			
Chrysine	1355(-79)	1246	1188
Me-Galangine	1364	1222	1187
Acacétine	1378	1238	1187
DiMe-Kempférol	1366	1223	1197
Me-Tricine	1363	1265	1194
TétraMe-Myricétine	1367	1240	1188
	"1365"	"1240"	"1190"

Phloracétophénone	1368	1252	1207
ω-Met-Phloracétophénone	1368	1250	1195

Les données de la littérature concernant la position des bandes d'absorption dues aux hydroxyles phénoliques sont moins précises que ne le sont les attributions précédemment citées. On rencontre généralement deux bandes, l'une entre 1310 et 1410 cm^{-1}, l'autre vers 1200 cm^{-1}; la valeur plus précise de 1350 cm^{-1} a été citée, mais sa validité a été discutée (BELLAMY p. 96, 110). BARCHEWITZ (213) donne toutefois 1370 et 1230 cm^{-1} comme valeurs des fréquences de déformation -OH phénoliques associés, se déplaçant à 1340 et 1175 cm^{-1} par rupture d'association.

Nous sommes donc tenté d'attribuer aux fonctions phénols (en 5 et 7) la bande "1365", intense et de position bien définie, dont la bande "1190" pourrait être le "compagnon" attendu (Dans la région 1170-1200 cm^{-1} règne toutefois chez nos composés une complexité qui peut laisser planer un doute sur l'exactitude de cette dernière attribution). Notons à l'appui de cette thèse que RIBEREAU-GAYON et JOSIEN (211), dans cette région du spectre de leurs dihydroxy-5-7-anthocyannes, obtiennent bien deux bandes "1340" et "1190".

Quant à la forte bande "1240", son origine peut être multiple: la région 1250 cm^{-1} est en effet caractéristique de l'enchaînement =C-O- (BELLAMY p.115-7-8), mais celui-ci figure en trois points de la molécule flavonique :

-oxygène hétérocyclique ;
-fonctions phénols ;
-groupements méthoxyles.

REGION VI : 1170-950 cm^{-1} (Noyau benzènique substitué)

Chrysine	1167	1027	1001
Me-Galangine	1160	1018	994
Acacétine	1164	1034	1011
DiMe-Kempférol	1164	1021	994
Me-Tricine	1163	1037	1008
TétraMe-Myricétine	1162	1021	1005
	"1164"	"1025"	"1000"
Phloracétophénone	1167	1023	-
ω-Met-Phloracétophénone	1164	1024	993

Cette région est caractérisée par les différents modes de substitution du noyau aromatique : la bande 1155±15 cm^{-1} (méta-substitution) a été notamment signalée (BELLAMY p.81-2).

La bande "1164", intense et de position bien définie doit donc être attribuée très probablement à la substitution méta des deux hydroxyles en 5 et 7. Mais la molécule flavonique présente trop de types simultanés de substitution aromatique, par son noyau A notamment, pour qu'une attribution complète des bandes puisse être tentée dans ce domaine.

REGION VII : 950-660 cm^{-1} (=CH- aromatiques principalement).

Chrysine	-	909	-	838	782
Me-Galangine	947	-	870	838	782
Acacétine	-	908	-	838	762
DiMe-Kempférol	947	-	873	836	796
Me-Tricine	947	-	862	834	770
TétraMe-Myricétine	-	912	853	833	768
	"947"	"910"	"865"	"836"	"770"
Phloracétophénone	-	-	-	-	-
ω-Met-Phloracétophénone	951	903	853	-	-

Tout comme précédemment, la complexité des substitutions interdit toute attribution, malgré l'existence de fréquences aussi bien définies que celle de la bande "836"; la pauvreté des spectres des phloracétophénones dans ce domaine suggère cependant que le noyau B soit à l'origine de la plupart des bandes observées.

Cette région est de plus la seule de l'ensemble du spectre I.R. où une distinction des six flavonoïdes semble a priori se manifester : chrysine et acacétine ("910") d'une part, méthyl-galangine et diméthyl-kempférol ("947" et "865") d'autre part; cependant la nature plus complexe des spectres de la méthyl-tricine et de la tétraméthyl-myricétine empêche de généraliser la distinction que l'on aurait été tenté de faire à cette occasion entre flavones et méthoxy-3-flavones.

En conclusion, une grande ressemblance existe dans toute l'étendue du domaine spectral, la presque totalité des bandes se retrouvant dans les six flavonoïdes (et les deux phloracétophénones) examinés. Aucune distinction nette n'apparaît notamment entre

dérivés méthoxylés et non méthoxylés,les bandes correspondant aux groupements $-CH_3$ étant situées en effet dans des régions où l'absorption est déjà intense, et la liaison éther-oxyde =C-O- ne présentant pas une spécificité suffisante.

Les méthoxy-3-flavones (ou méthyl-3-flavonols) examinées se rapprochent donc des flavones, ce qui recoupe les données de la spectrophotométrie U.V. sur leur configuration électronique. Toutefois, entre deux termes homologues, un léger abaissement de la fréquence carbonyle différencie la méthoxy-flavone de la flavone.

Les bandes d'absorption dues aux groupements =CO, noyau aromatique (et sa conjugaison exogène), -OH (-OH phénolique), éther-oxyde, dihydroxy-5-7- (méta-substitution) ont été attribuées (*).

Certains indices obtenus par l'examen des fréquences hydroxyles et carbonyles sont en faveur d'une interaction des groupements -OH en 5 et =CO en 4.

Cette brève étude nous a donc permis d'avancer des hypothèses concernant la structure de quelques flavonoïdes; il serait bon toutefois, semble-t-il, qu'elles puissent être étayées par des arguments plus divers, ce qui doit pouvoir s'atteindre par la réalisation du programme suivant :

I/ Achèvement de l'étude de la série des dihydroxy-5-7-méthoxy-flavones et des dérivés 3-méthoxylés correspondants, par examen du couple 3'-4'-diméthoxylé ;

2/ Etude de la série analogue de la résorcine, de la résacétophénone à l'hydroxy-7-tétraméthoxy-3-3'-4'-5'-flavone;

3/ Etude des vingt composés concernés, en solution dans le tétrachlorure de carbone.

Si les points 1 et 2, pris isolément doivent en effet apporter des informations supplémentaires de même nature que ceux précédemment cités, des données complémentaires viendront probablement du point 2 par comparaison à 1, terme homologue à terme homologue, ce qui nous donnera ainsi la possibilité de confirmer ou d'infirmer plus directement l'hypothèse de l'interaction de 1'-OH en 5 et du =CO en 4. Le point 3 enfin, permettrait d'éliminer l'éventuelle influence des liaisons intermoléculaires dans l'interprétation des résultats; notons toutefois que, selon les résultats de HENRY et MOMBO (209), pour la bande =CO, le passage de l'état cristallisé à l'état dissous s'accompagne d'une différence (+ 3 à + 10 cm^{-1}) non négligeable certes, mais constamment

---

(*) Nous avons retrouvé tout ou partie de ces bandes dans des spectres assez différents d'autres flavonoïdes, en particulier dans celui de la quercétine communiqué par CRONENBERGER.

positive et ne devant donc pas trop entacher la discussion comparée de deux termes voisins, et les conclusions basées sur les valeurs obtenues en phase solide.

5.2.3. Etude chromatographique.

L'étude chromatographique comparée des flavones et méthyl-3-flavonols a fourni les résultats suivants:

	Chrysine	Me-Galangine	Acacétine	DiMe-Kempférol	Me-Tricine	TétraMe-Myricétine
Acide acétique 15 %	0,2 T	0,0	0,1 T	0,2 T	0,1 T	0,0
Acide acétique 30 %	0,5 T	0,0	0,3 T	0,5 T	0,0	0,0
Solvant de Linstedt(*)	0,2 T	0,0	0,1 T	0,3 T	0,0	0,0
m-Crésol saturé d'eau	.....	.....	au front	.....	.....	.....
Solvant de Bate-Smith	.....	.....	au front	.....	.....	.....
Solvant Forestal	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89
Solvant de Partridge	0,92	0,93	0,90	0,91	0,89	0,91
Acide acétique 60 %	0,75	0,73 t	0,68	0,77	0,72	0,77
Me-Et-Cétone sat. AmOH 2N	0,69	0,79	0,67	0,78	0,60	0,68

(*) Benzène - Ether de pétrole 85-105°C - Méthanol - Eau : (50)-(50)-(1)-(50). (214).

Les six composés présentent la même fluorescence brun-violet sombre en lumière U.V., inchangée en atmosphère ammoniacale. Dans la plupart des quelques solvants se montrant aptes à fournir des taches bien définies, les propriétés chromatographiques sont également très voisines, voire identiques.

On remarquera le caractère fortement lipophile de ces flavonoïdes, et leur tendance à fournir des trainées due à leurs

solubilités généralement faibles; même le solvant de Linstedt tout particulièrement recommandé pour l'analyse des flavones polyméthoxylées ne convient pas dans notre cas particulier, et le problème de la séparation analytique de ces flavonoïdes deux à deux n'a pu être résolu avec succès que par l'emploi du solvant méthyl-éthyl-cétone saturée d'ammoniaque 2N (préconisé par MEAD et coll.(215) pour la séparation des coumarines et appliqué aux flavones peu hydroxylées par WINICKI et coll.(216)).

On notera que si les valeurs de Rf ont tendance à s'abaisser avec le degré de méthoxylation du noyau B, les méthoxy-3- flavones présentent dans les deux derniers solvants des Rf supérieurs à ceux des flavones homologues; de plus, deux isomères comme l'acacétine et la méthyl-galangine sont bien séparables : le groupement méthoxyle en 3 apparaît donc comme tout particulièrement lipophile.

L'exemple de telles similitudes analytiques doit donc rendre prudent dans l'étude des flavonoïdes (surtout si l'on mentionne que les propriétés cryométriques des méthoxy-3-flavones peuvent également prêter à confusion), et il convient donc bien de multiplier les preuves expérimentales dans l'étude structurale des composés naturels. Il n'est pas exclu de plus, que ces ressemblances des propriétés puissent être en partie à l'origine du peu de fréquence des méthoxy-3-flavones actuellement signalées dans les milieux végétaux.

CONCLUSIONS

Depuis plusieurs décennies, le problème chimique posé par les "tanins" du houblon restait sans réponse, et seuls de récents développements de la chimie des flavonoïdes ont permis à quelques chercheurs des progrès sensibles en ce domaine; engager cette étude impliquait la possession de bases solides concernant la structure, les propriétés et l'analyse des leucoanthocyannes (Dihydroxy-3-4-flavannes), composés actuellement reconnus, à l'égal des catéchines (Hydroxy-3-flavannes), comme d'éventuels constituants essentiels des tanins végétaux : une mise au point générale est présentée à cet effet.

Les cônes de houblon sont en effet particulièrement riches en leucodérivés, en moyenne 2,1 % poids sec, soit une part prépondérante des tanins de cette espèce végétale. Deux leucoanthocyannes ont été identifiés : leucocyanidine, plus abondante, et leucodelphinidine, dont l'analyse chromatographique prouve l'existence sous cinq formes distinctes, aglycones, monomères, vraisemblablement stéréoisomères, dont la polymérisation spontanée conduit à la formation de tanins leucoanthocyaniques condensés.

Les leucodérivés ne sont pas les seuls flavonoïdes du houblon, mais sont accompagnés de glycosides de flavonols(Hydroxy-3-flavones); à côté de la quercétine, depuis longtemps signalée, l'existence du kempférol a pu être démontrée.

La distribution de ces quatres constituants flavoniques essentiels, particulièrement spécifique, a été examinée dans les différents organes de la plante : ces flavonoïdes se trouvent également dans les feuilles, où leurs proportions relatives diffèrent de celles observées dans les cônes mûrs et fleurs(les formes dihydroxylées en 3' et 4' sont en effet moins abondantes).

Ces données statiques sont complétées par une étude de l'évolution saisonnière des flavonoïdes: les flavonols des feuilles se caractérisent par une teneur relativement faible (0,43 %) et constante, tandis que les leucoanthocyannes sont plus abondants (quelques %) et subissent d'importantes variations absolues et relatives. Le métabolisme des leucodérivés, dont la teneur dans les feuilles passe par un maximum accusé au cours du mois de Juin, apparaît de plus étroitement lié à celui de l'acide ascorbique.

Ces divers résultats constituent la base essentielle d'une future étude biogénétique à l'aide de carbone 14, mais permettent également de rejeter et d'avancer dès maintenant

quelques hypothèses à ce sujet:

- Les feuilles du houblon peuvent être considérées comme des sites privilégiés de la biosynthèse flavonique, dont les cônes, à teneur décroissant jusqu'à la maturité, constitueraient essentiellement des lieux d'accumulation et de réserve.

- Flavonols et leucoanthocyannes sont susceptibles de dériver d'un précurseur commun, l'orientation des chaînes biogénétiques dépendant du potentiel rédox cellulaire; cependant le peu de dépendance quantitative des métabolismes respectifs des deux groupes de composés conduit à admettre l'existence d'un précurseur commun éloigné, peut-être dès le stade C_6-C_3 (noyau B et enchaînement initial de l'hétérocycle) avant même les réactions d'hydroxylation du phényle latéral. (Ce dernier problème apparaissant ici tout particulièrement important en raison des divers types de substitution rencontrés dans le houblon).

Une dernière partie de cette étude a été suscitée par les synthèses que nécessite l'obtention de flavonols (et leucoanthocyannes) de référence : les méthoxy-3-flavones intermédiaires de ces réactions ont été étudiées, notamment sous l'angle de l'ensemble de leurs propriétés spectrophotométriques; les résultats obtenus soulignent leur grande similitude avec les flavones homologues et ont permis d'aborder le problème encore peu étudié que pose l'interprétation des spectres I.R. des flavonoïdes.

BIBLIOGRAPHIE

(1) DEKKER J.- Die Gerbstoffe; Bornträger (Berlin), (1913), 467.
Cité par HILLIS (84).

(2) DEZANI S.- Staz.sperim.agr.ital.Modena (1910), 43, 428
Cité par TSWETT (5).

(3) LABORDE J.- C.R. (1908),146, 1411; 147, 753 ; 993.

(4) MALVEZIN P.-C.R. (1908),147, 384.

(5) TSWETT M. - Biochem. Z . (1914), 58, 225.

(6) STAATS G. - Ber. (1895),28 , 2807.

(7) WILLSTÄTTER R., EVEREST A.E.- Liebigs Ann.Chem.(1913),401, 189.

(8) ROSENHEIM O. - Biochem. J. (1920), 14, 178.

(9) JONESCO S. - C.R.(1921), 173, 1006; (1922), 175, 592.
C.R. Soc.Biol.Sect.Roum.(1927), 97, 975.

(10) KOZLOWSKI A. - C.R. (1921), 173, 855.

(11) ROBINSON G.M., ROBINSON R.- Biochem.J. (1933), 27, 206.

(12) ROBINSON G.M., ROBINSON R.- J.Chem.Soc.(1935), 744.
APPEL H., ROBINSON R.- J.Chem.Soc.(1935), 752.

(13) ROBINSON R.- Nature (1936), 137, 172.

(14) ROBINSON G.M.- J.Chem.Soc. (1937),1157.

(15) ROBINSON R., ROBINSON G.M.- J.a.c.S. (1939), 61, 1605.

(16) LAWRENCE W.J.C., PRICE J.R., ROBINSON G.M., ROBINSON R.-
Philos.trans. (1939-41), B 230, 149.

(17) BANCROFT W.D., RUTZLER J.E. - J.a.c.S. (1938),60, 2738 ; 2945
RUTZLER J.E. - J.a.c.S. (1939), 61 , 1160.

(18) FINCKE H. - Z.Untersuch. Lebensmitt.(1941), 82, 209.
(Chem. Zentralbl. 1941), I, 943).

(19) HERMANN G.- Bull.Sect.Sci. Acad.Roum. (1942), 24, 492
(C.A.(1943),37,6003)(Chem.Zentralbl.(1942),II,1470).

(20) PARIS R.- Ann. Pharm. Fr. (1951), 9, 124.

(21) TAYEAU F.,MASQUELIER J.- Bull.Soc.Chim.(1948), 1167.
- C.R. (1948), 227, 602.
- Bull.Soc.Chim.Biol. (1949),31, 72.

DAVID R.,MASQUELIER J.- C.R.(1952), 235, 1325.

(22) ADLER E.- Svensk Papp.Tidn.(1951), 54, 445.
Cité par HILLIS (86).

(23) BATE-SMITH E.C.- J.Exp.Botan.(1953),4, 1.
(C.A. (1954), 48, 815 d).

(24) BATE-SMITH E.C., SWAIN T.- Chem.Ind.(1953), 377.

(25) BATE-SMITH E.C.- Biochem. J. (1954), 58, 122.
BATE-SMITH E.C., LERNER N.H.- ibid., 126.

(26) BATE-SMITH E.C.- Adv.Food Res.; Acad.Press.(1954),5, 261.
(C.A.(1955), 49, 1985 f).

(27) BATE-SMITH E.C.- Food (1954), 23, 124.
(C.A.(1954), 48, 7805 e).

(28) BATE-SMITH E.C.- Sci.Proc.Roy.Dublin Soc.(1956),27, 165.

(29) SWAIN T., BATE-SMITH E.C.- Soc.Leath.Tr.Chem.Croydon Symp.(1956),
The Chemistry of vegetable Tannins, 109.

(30) BATE-SMITH E.C.- Proc.Symp.Pharmacol.Plant.Phenol., Oxford(1958);
Acad.Press., 153.

(31) FORSYTH W.G.C.- Nature (1949), 164, 25.

(32) FORSYTH W.G.C.- Biochem.J.(1952),51, 511; 516.

(33) FORSYTH W.G.C.,ROMBOUTS J.E.- J.Sci.Food.Agr.(1952), 3, 161.
(C.A.(1952), 46, 7677 c).

(34) FORSYTH W.G.C.- Nature (1953), 172, 726.

(35) FORSYTH W.G.C.- Biochem.J. (1955), 60, 108.

(36) KING F.E., BOTTOMLEY W.- Chem. Ind. (1953), 1368.

(37) KING F.E., BOTTOMLEY W.- J.Chem.Soc.(1954), 1399.
BOTTOMLEY W.- Chem. Ind.(1954),516.

(38) KING F.E., CLARK-LEWIS J.W.- Chem.Ind.(1954), 757.

(39) KING F.E., CLARK-LEWIS J.W.- J.chem.Soc.(1955),3384.

(40) KING F.E.- Sci.Proc.Roy.Dublin Soc.(1956), 27, 87.

(41) FREUDENBERG K., ROUX D.G.- Naturwiss.(1954), 41, 450.

(42) FREUDENBERG K., WEINGES K.- Liebigs Ann.Chem.(1954),590, 140 .

(43) FREUDENBERG K., WEINGES K.- Angew.Chem.(1958),70, 51.

(44) FREUDENBERG K., ALONSO DELAMA J.M.- Liebigs Ann.Chem.(1958),
612, 78.

(45) ROUX D.G.,FREUDENBERG K.- Liebigs Ann.Chem.(1958), 613, 56.

(46) FREUDENBERG K.,WEINGES K.-Liebigs Ann.Chem.(1958), 613, 61.

(47) WEINGES K.- Liebigs Ann.Chem.(1958), 615, 203.

(48) FREUDENBERG K.,WEINGES K.- Fortschr.Chem.Org.Naturst.(1958),
Springer; 15, 5.

(49) FREUDENBERG K.,WEINGES K.- Chem.Ind.(1959), 486.

(50) WEINGES K.- Liebigs Ann.Chem. (1959), 627, 229.

(51) FREUDENBERG K.- Experientia (1960), 16, 101.

(52) JOSHI C.G., KULKARNI A.B.- Chem.Ind.(1954),1421.

(53) KULKARNI A.B.,JOSHI C.G.- Chem.Ind.(1954), 1456.

(54) KULKARNI A.B., JOSHI C.G.- Chem.Ind.(1956), 124.

(55) JOSHI C.G., KULKARNI A.B.- J.Indian Chem.Soc.(1957),34, 753. (C.A. (1958),52, 7306 c).

(56) JOSHI C.G., KULKARNI A.B.- J.Sci.Ind.Res.India(1957),16 B,307; 355.(C.A.(1958),52, 5397 e).

(57) CHANDORKAR K.R.,KULKARNI A.B.- Current Sci.India(1957),26,354. (C.A.(1958), 52, 11064 e).

(58) KASHIKAR M.D.,KULKARNI A.B.- Chem.Ind.(1958), 1084.

(59) GANGULY A.K.,SESHADRI T.R.,SUBRAMANIAN P.- Tetrahedron(1958), 3, 225.

(60) LAUMAS K.R.,SESHADRI T.R.- J.Sci.Ind.Res.India (1958),17 B,44; 167. Cité par SESHADRI (64).

(61) GANGULY A.K.,SESHADRI T.R.- J.Sci.Ind.Res.India (1958),17 B, 168. Cité par SESHADRI (64).

(62) LAUMAS K.R.,SESHADRI T.R.-Proc.Indian Acad.Sci.(1959),49 A,47. (C.A.(1959), 18022 g).

(63) GANGULY A.K.,SESHADRI T.R.- Tetrahedron (1959),6, 21.

(64) SESHADRI T.R.- Tetrahedron (1959), 6, 169.

(65) BRADFIELD A.E., PENNEY M.- J.Chem.Soc.(1948),2249.

(66) PACHECO H.,CRONENBERGER L.,MENTZER C.- Bull.Soc.Chim.Biol. (1957), 39, 439.

(67) KING F.E.- C.R. Coll.Hétéroc.oxyg.Lyon C.N.R.S.(1955),135.

(68) KEPPLER H.H. - Chem. Ind. (1956), 380.

(69) RIBEREAU-GAYON P.- C.R. Acad.Agr.Fr.(1957),43,197;596;821.

(70) KEPPLER H.H.- J.chem.Soc. (1957), 2721.

(71) LEBRETON P.- P.J.Brass.Belg.(1957),2641-3,253;275;288.

(72) MANSON D.W.- T.A.P.P.I.(1960), 43, 59.

(73) CLARK-LEWIS J.W.,MITSUNO M.- J.chem.Soc.(1958),1724.
MITSUNO M.,YOSHIKAZI M.- J.pharm.Soc.Jap.(1957),77,557; 1208.

(74) ROUX D.G. - Nature (1957), 180, 973.

(75) ROUX D.G. - Nature (1958), 181, 1454.

(76) ROUX D.G.,EVELYN S.R.- Biochem.J.(1958),69,530; 70, 344.

(77) ROUX D.G.,EVELYN S.R.- J.Chromato.(1958),1, 537.

(78) ROBERTS E.A.H.,WOOD D.J.- Biochem.J.(1953),53, 332.
ROBERTS E.A.H.,WOOD D.J.,CARTWRIGHT R.A.-J.Sci.Food Agr.(1956), 7, 253; 637.

(79) ROBERTS E.A.H.- Soc.Leath.trad.Chem.;Croydon Symp.(1956),87

(80) WILLIAMS A.H.- Chem.Ind. (1953), 540.

(81) KIESER E., POLLARD A.,WILLIAMS A.H.- Chem.Ind.(1953),1260.

(82) HATHWAY D.E. - Biochem. J. (1958), 70, 34.

(83) PIGMAN W., ANDERSON E.,FISCHER R.,BUCHANAN M.R.,BROWNING B.L.- T.A.P.P.I.(1953), 36,4.

(84) HILLIS W.E. - J.Soc.Leath.Trad.Chem.(1954),38,91 .

(85) HILLIS W.E. - Nature (1955), 175, 597.

(86) HILLIS W.E. - Austr.J.Biol.Sci. (1956), 9, 263.

(87) HILLIS W.E. - Soc.Leath Trad.Chem.; Croydon Symp.(1956),121.

(88) SWAIN T. - Chem.Ind. (1954), 1144.

(89) ROUX D.G., BILL M.C. - Nature (1959), 183 , 42.

(90) MAURICE A.,MENTZER C.- Bull.Soc.Chim.Biol.(1954),36, 369.

(91) ROUX D.G. - J.Soc.Leath.Trad.Chem.(1955), 39, 80.

(92) ROUX D.G.- Chem.Ind.(1958),161.
- Meeting Plant Phenolic Group,London (1959).

(93) HILLIS W.E.,URBACH G.- Nature (1958), 182, 657.
HILLIS W.E. - Nature (1958), 182, 1371.

(94) HILLIS W.E.,CARLE A.- Biochem.J. (1960), 74, 607.
HILLIS W.E.,CARLE A.- Holzforschg.(1958),12, 136.

(95) WHITE T. -Soc.Leath.Trad.Chem.,Croydon Symp.(1958),7.
KING H.G.C.,WHITE T.- ibid. , 31.

(96) KING H.G.C.,WHITE T. - J.Soc.Leath.Trad.Chem.(1957),41, 368.

(97) WHITE T. - J.Sci.Food Agr.(1957), 8, 377.

(98) WHITE T.,KING H.G.C.- Chem.Ind.(1958), 291.

(99) ROUX D.G. - Nature (1957), 179, 305.

(100) HARBORNE J.B.- J.Chromato.(1958), 1 , 473.
(1959), 2, 649.

(101) GEISSMANN A.,JORGENSEN E.C.,HARBORNE J.B.-Chem.Ind.(1953),1389.
GEISSMANN A.,JURD L. - Arch.Biochem.Biophys.(1955),56, 259.

(102) HARBORNE J.B. - Biochem.J.(1958),70, 22.

(103) RIBEREAU-GAYON P.- Thèse Doct.Sci.Fac.Bordeaux (1959).

(104) HILLIS W.E.,SWAIN T. - Nature (1957),179, 586.
SWAIN T.,HILLIS W.E. - J.Sci.Food Agr.(1959),10, 63.
HILLIS W.E.,SWAIN T. - -ibid.- 135.

(105) CRONENBERGER L. - Thèse Doct.Sci.Fac.Lyon (1960).

(106) BAUER L.,BIRCH A.J.,HILLIS W.E.-Chem.Ind.(1954),433.

(107) BOGNAR R.,RAKOSI M. - Chem.Ind.(1956), 188.

(108) CLARK-LEWIS J.W.,ROUX D.G.- Chem.Ind.(1958), 1475.

(109) BIRCH A.J.,CLARK-LEWIS J.W.,ROBERTSON A.V.- J.chem.Soc.(1957), 3586.

(110) PRELOG V.- Helv.Chim.Acta (1953), 36, 308.

(111) FREUDENBERG K. - Angew.Chem.(1955), 67, 728.
- Sci.Proc.Roy.Dublin Soc.(1956),27, 153.

(112) HARDEGGER E.,GEMPELER H.,ZÜST A.- Helv.Chim.Acta(1957),40,1819.

(113) KING F.E.,CLARK-LEWIS J.W.,FORBE W.F.- J.Chem.Soc.(1955),2949.

(114) WHALLEY W.B. - Soc.Leath.Trad.Chem.,Croydon Symp.(1956),151.
Cité par BIRCH (109).

(115) CLARK-LEWIS J.W.- Heterocycl.Chem.Çamberra Symp.
Chem.Soc.spec.Publ.(1957).

(116) MAHESH V.B.,SESHADRI T.R.- Proc.Indian Acad.Sci.(1955),41,210.
Cité par SWAIN (29).

(117) MOZINGO R.,ADKINS H.- J.a.c. S.(1938),60, 669.

(118) FREUDENBERG K.,WEINGES K.- Résultat inéd.,cité in (51);
voir aussi(50).

(119) PERKIN A.G.,COPE F.- J.chem.Soc.(1895), 67, 937.
PERKIN A.G. - J.chem.Soc.(1905), 87, 715.

(120) CHARLESWORTH H.H.,CHAVAN J.J.,ROBINSON R.- J.chem.Soc.(1933),370.

(121) FORSYTH W.G.C.,HASSALL C.H.,ROBERTS J.B.- Chem.Ind.(1958),656.
CHAN W.R.,FORSYTH W.G.C.,HASSALL C.H.- J.chem.Soc.(1958),3174.
Chem.Ind.(1957),264.

(122) FORSYTH W.G.C.,ROBERTS J.B.- Chem.Ind.(1958),755.

(123) GRAMSHAW J.W.,JOHNSON A.W.,KING T.J.- J.chem.Soc.(1958),4040.

(124) MIRZA R.,ROBINSON R.- Nature (1950),166, 997.

(125) KING H.G.C.,WHITE T.- J.chem.Soc.(1957), 3901.

(126) KUHN R.,WINTERSTEIN A.- Ber.(1932), 65, 1742.

(127) KARRER P.,SEYHAN M.- Helv.Chim.Acta (1950),33,2209.

(128) FREUDENBERG K.,KARIMULLAH,STEINBRUNN G.- Liebigs Ann.Chem.(1935),
518, 37.

(129) ROUX D.G. - Nature (1959), 183, 890.

(130) RIBEREAU-GAYON J.,RIBEREAU-GAYON P.- C.R.(1954),238, 2188.

(131) ROUX D.G.,MAIHS A.E. - Nature (1958), 182, 1798.

(132) GAKHOKIDSE A.M.- J.appl.Chem.U.S.S.R.(1946),19, 1197.
(C.A.(1948), 42, 559 c).

(133) BERZIN T.,MÜLLER A.,SCHWARZ H.- Arzeinmitt.forsch.(1955),5,490.
BERZIN T.- Schweiz.Apoth.Ztg.(1957),95, 403.
Cités par FREUDENBERG (46).

(134) SHANTZ E.M.,STEWARD F.C.- Plant Physiol. (1955), 30, Proc.Meet.Suppl.XXXV.

(135) ERDTMAN H.- Coll.Hétérocyc.Oxyg. C.N.R.S.Lyon,(1955), 229.

(136) HUTCHINSON J.- A Botanist in South Africa (1946); - British Flowering Plants (1948);Gawthorn.

(137) DORMER K.J.- New Phytol. (1946), 45, 145.

(138) METCALFE C.R.,CHALK L.- Anatomy of Dicotyledons (1950),Clarendon.

(139) STEARNS J.L.,HARTLEY C.-J.For.Prod.Res.Soc.(1952),2, 58.
LINDNER R.C.,FITZPATRICK H.C.,WEEKS T.E;-Science(1950),112,119.
Cités par HILLIS (86).

(140) LEBRETON P.- Thèse Univers. Lyon (1957).

(141) WHELDALE M.- Proc.Roy.Soc.(1909),81,44.
- Proc.Cambridge Phil.Soc.(1909), XV, II.
- J.Genetics (1911), I, 133.
Cités par WILLSTÄTTER (7).

(142) SIMMONDS N.W. - Nature (1954), 173, 402.

(143) ALSTON R.E.,HAGEN C.W.- Nature (1955), 175 , 990.

(144) STEPHENS S.G. - Arch.Biochem.(1948),18 , 449.
- Genetics (1948), 33, 191.
Cités par SWAIN (29).

(145) SEYFFERT - Z.Indukt.Abstamm.Vereblehre (1955),87 , 311.
Cité par SWAIN (29).

(146) GEISSMANN T.A.,HINREINER N.- Botan.Rev.(1952),18, 77.

(147) CRONENBERGER L.- Soc.Suj.Thèse Doct.Lyon (1960).

(148) CRONENBERGER L.,VALLET C.,NETIEN G.,MENTZER C.- C.R.(1955), 241, 1161.

(149) HASEGAWA M.,NAKAGAWA T.,YOSHIDA S.- J.Jap.For.Soc.(1957),39,159.

(150) HASEGAWA M. - J.Jap.For.Soc.(1958),40 ,111.

(151) LI K.C. - Nature (1959), 183, 1935.

(152) ROBERTS E.A.H.- J.Sci.Food Agr.(1958), 9, 381.

(153) SIMMONDS N.W. - Ann.Botany (1954), 28, 471.

(154) ETTI C.- Ann.Chem.Pharm. (1876), 180, 223.

(155) HAYDUCK M.- Woch.schr.Brau.(1894),92, 813; 94, 409.

(156) CHAPMAN A.C.- J.Inst.Brew.(1907),640; (1909), 360.
Cité par HARRIS (164).

(157) BILGRAM H.- Woch.schr.Brau.(1929),46,137; (1931), 48, 493.

(158) NIERENSTEIN M. - The natural organic Tanins,(1934);Churchill.

(159) HEINTZ L.- Schweiz. Brau.Rdsch.(1936), 47, 163.

(160) DE CLERCK J.- Cours de Brasserie, (1948); Van Linthout.

(161) (HARRIS G. in) Brew.Ind.Res.Found.;Ann.Rep.(1952)-
J.Inst.Brew.(1953), 59, 121.

(162) VANCRAENENBROECK R., LONTIE R.- Bull.Assoc.Etud.Brass.Louvain
(1955), 51, 1 .

(163) McFARLANE W.D.,WYE E.,GRANT H.L.- Proc.Eur.Brew.Conv.(1955),298.

(164) HARRIS G.- J.Inst.Brew.(1956), 62, 390.

(165) MICHEL G.,LEBRETON P.- C.R.(1956), 243, 1071.
LEBRETON P.A.,GAGNAIRE B.J.,MICHEL G.F.- Wallerstein Lab.Comm.
(1957), 20, 233.

(166) HARRIS G.,RICKETT R.W.- Chem.Ind.(1958), 686.
- J.Inst.Brew.(1958), 64, 22 .

(167) BATE-SMITH E.C.- Biochem.Soc.III Symp. (1950), 62.

(168) EVANS R.A.,PARR W.H.,EVANS W.C.- Nature (1949),164,674.

(169) WAGNER J.R. - Jahresber.Chem. (1859), 585.
SEYFFERT H. - Woch.sch.Brau. (1904), 21,483; (1906),23, 545.
Cités par HARRIS (164).

(170) UMEDA Y.,KOSHIHARA M. - Proc.Jap.Acad.(1954),30, 387.
UMEDA Y.,KOSHIHARA M. - Brauwiss.(1959), 12, 284.

(171) HARBORNE J.B.- J.Chromato. (1959),2 , 581.

(172) MENTZER C.,PACHECO H.- Bull.Soc.Chim.Biol.(1952),34 , 576.

(173) HATTORI S.,MATSUDA H.- Acta phytochim.Jap.(1949),15, 233.
(C.A.(1950), 44, 3214 i).

(174) CRONENBERGER L.- C.R. (1959), 249, 2866.

(175) GEISSMANN T.A.- in PAECH K. & TRACEY M.V.- Moderne Methoden der
Pflanzenanalyse,3,450;Springer(1950).

(176) DANIELSON C.E.- Arkiv Kemi (1953), 5, 173.

(177) HAGDAHL L.,DANIELSON C.E.- Nature (1954),174, 1062.

(178) SANNIE C.,SAUVAIN H.- Les Couleurs des Fleurs et des Fruits.
Mémoires Mus.Nat.Hist.Nat. (1952).

(179) CHADENSON M.,MOLHO-LACROIX L.,MOLHO D.,MENTZER C.- C.R.(1955),
240, 1362.

(180) PACHECO H.- Bull.Soc.Chim.Biol. (1955), 37, 723.

(181) JURD L.,HOROWITZ R.M.- J.org.Chem.(1957),22, 1618.

(182) ABBOT M.T.J.,GROVE J.F.,McCLOSKEY P. - J.chem.Soc.(1958),1699.

(183) PARIS R.R.,BEZANGER-BEAUSQUESNE L. - C.R.(1956),242, 1761.

(184) LEBRETON P.- Brass.Fr. (1958), 13 , 104.

(185) PACHECO H.,CHADENSON M.- C.R.(1956), 242, 1761.
PACHECO H. - Bull.Soc.Chim. (1956), 1600.
PACHECO H. - Bull.Soc.Chim.Biol.(1957), 39, 971.

(186) GOVAERT F.,VERZELE M.,ANTEUNIS M.,FONTYN F.,STOCKX J.- Experientia (1957), 13, 105.

(187) MOEWUS F.,DEULOFEU V.- Nature (1954), 173, 218.

(188) LINKE W.,REBL A. - La Culture du Houblon,(1948); Dunod. (Trad.Fr.par APPERT M. de"Der Hopfenbau",Hans Carl)
MENERET G. - Station Dijon C.N.R.A., comm.person.

(189) BATE-SMITH E.C. - Comm. person. Juillet 1957.

(190) LEBRETON P.,MICHEL G.- C.R. III Congr.Intern.Ind.Ferment. (1958), 141.

(191) SESHADRI T.R. - Proc.Indian Acad.Sci.(1948),28,1; 30, 333. Cité par GEISSMANN (146).

(192) RAO P.S., SESHADRI T.R.- Proc.Indian Acad.Sci.(1943),18 A,222. Cité par GEISSMANN (146).

(193) TESTONI - Gazz.Chim.Ital. (1900), 30, ii, 327 Cité par KALFF (194).

(194) ROBINSON R.,ALLAN J. - J.chem.Soc.(1924), 125, 2192.
KALFF J.,ROBINSON R. - ibid. (1925), 127, 181.
ROBINSON R.,SHINODA R.- ibid. (1925), 127, 1973.
HEAP T.,ROBINSON R. - ibid. (1926), 2336.

(195) SLATER W.K.,STEPHEN H.- J.chem.Soc.(1920), 117, 316.

(196) Organic Syntheses, 13, 56.

(197) Organic Syntheses, 6 , 96.

(198) HEAP T.,ROBINSON R.- J.chem.Soc.(1929),67.

(199) HATTORI S.- Acta Phytochim. Jap.,4, 41. (Chem.Zentralbl.(1928), II, 1090).

(200) SKARZINSKY B.- Biochem. Z. (1939), 301, 150.

(201) TEOULE R. - Bull.Soc.Chim. (1959), 423.

(202) MENTZER C., PILLON D.- C.R. (1952), 234, 444.

(203) MENTZER C., PILLON D.- Bull.Soc.Chim. (1953), 538.

(204) PILLON D. - Bull.Soc.Chim. (1954), 9.

(205) KUHN R., LÖW I. - Ber. (1944),77, 211.

(206) BELLAMY L.J. - The Infra-Red Spectra of Complex Molecules; (1958), Methuen.

(207) HERGERT H.L.,KURTH E.F.- J.a.c.S.(1953), 75, 1622.

(208) SHAW B.L.,SIMPSON T.H.- J.chem.Soc.(1955),655.

(209) HENRY L.,MOLHO D.- C.R.Coll.CNRS Hétérocycl.Oxyg.(1955),Lyon,341

(210) INGLETT G.E.- J.Organ.Chem. (1958),23, 93.

(211) RIBEREAU-GAYON P.,JOSIEN M.L.- Bull.Soc.Chim.(1960),934.

(212) GRIPENBERG J.- C.R. Coll.CNRS Hétérocycl.Oxyg.Lyon,(1955),85.

(213) BARCHEWITZ P. - C.R.(1953),237, 237.
Cité par (211).

(214) LINSTEDT G. - Acta Chem.Scand.(1950), 4, 448.
LINSTEDT G.,MISIORNY A.- Acta Chem.Scand.(1951),5, 448.

(215) MEAD J.A.R.,SMITH J.N.,WILLIAMS R.T.- Biochem.J.(1958),68, 61.

(216) WINICKI B.,CHOPIN J.,CIER A.,NOFRE C.- C.R.(1960),251, 103.
WINICKI B.,CIER A.,CHOPIN J.,NOFRE C.- Bull.Soc.Chim.(1960),
sous presse.

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

L'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE AVEC GRADIENT D'ELUTION

Vu :
Les Membres du Jury,

M.M. J.COLONGE
R.KÜHNER
J.CHOPIN
C.MENTZER

Vu et approuvé :
Le Doyen de la Faculté des Sciences,

H.GAUTHIER

Vu et accordé le permis d'imprimer :
Lyon, le 17 Septembre 1960

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,

A.ALLIX